



**Sofia Isabel Almeida
Campino Martins do
Vale**

**Perfil de expressão génica do Monócito e Célula
Dendrítica na Artrite Reumatóide**



**Sofia Isabel Almeida
Campino Martins do
Vale**

**Perfil de expressão génica do Monócito e Célula
Dendrítica na Artrite Reumatóide**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto Equiparado da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra da Universidade de Coimbra, e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família, por todo o seu apoio incondicional

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto Equiparado da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Maria de Carvalho Lima

Professora Auxiliar do Instituto de Ciência Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

agradecimentos

Desde já deixo os meus agradecimentos ao Doutor Artur Paiva, por me ter dado esta oportunidade e por toda a orientação dada e conhecimentos transmitidos.

Um grande obrigado à Doutora Rosário Domingues, pela sua disponibilidade e orientação ao longo de todo o mestrado, e por todo o tempo dedicado.

Obrigada à médica do CHUC, a Dra. Cátia Duarte, pela sua disponibilidade e colaboração ao longo deste trabalho.

Os meus agradecimentos à equipa do Instituto Português do Sangue e Transplantação de Coimbra, em especial à Ju e à Susana, pela orientação no laboratório e ajuda inestimável para a parte de citometria de fluxo, e ao Dr. Martinho e Dra. Albertina pela valiosa orientação na parte de Genética Molecular.

Um enorme obrigado à Sílvia, colega de laboratório e amiga inesperada, pela sua presença através dos bons e maus momentos, pela constante companhia e amizade, e por toda a ajuda prestada ao longo do ano.

Obrigado a todos os meus amigos que permaneceram comigo e me deram forças para continuar, à Inês e à Estrelinha pela companhia, apoio, ajuda e provas de amizade que mais ninguém poderá superar.

Um especial agradecimento à minha família, aos meus pais pelo apoio e amor incondicional e pelas oportunidades que tive na minha vida, às minhas irmãs pelos bons e maus momentos que sempre me proporcionaram, à minha prima Sara pela sua constante força e presença.

palavras-chave

artrite reumatoide, monócitos, células dendríticas, citocinas, CX3CR1

resumo

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune crónica, que afeta as articulações pode levar a várias complicações sistémicas nos doentes. Para uma melhor compreensão desta doença, torna-se relevante estudar as várias células do sistema imunitário envolvidas na fisiopatologia e progressão da AR.

Assim, neste trabalho, pretendeu-se avaliar o papel das subpopulações de monócitos e células dendríticas (DC) do sangue periférico na AR, células cruciais no desenvolvimento e perpetuação da resposta inflamatória. Os monócitos e DC migram para o local de inflamação, onde são responsáveis pela apresentação de antígenos às células T e pela libertação de vários mediadores solúveis, nomeadamente citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a inflamação crónica observada na AR.

Com este objetivo, foram analisadas 23 amostras de sangue periférico de doentes com AR, em vários estágios de atividade da doença, e 21 amostras de indivíduos saudáveis (grupo controlo). As populações de monócitos (monócitos clássicos, intermédios HLA-DR⁺, intermédios HLA-DR⁺⁺ e não clássicos) e DC (mieloides (mDC) e plasmacitoides (pDC)) foram quantificadas através da expressão de marcadores específicos por citometria de fluxo. Posteriormente, as várias subpopulações foram separadas por *cell sorting* para o estudo da expressão génica de IL-10, IL-12p35 e TNF- α , e de CX3CR1, por qPCR.

Observou-se no grupo de doentes um decréscimo do número e frequência de monócitos não clássicos, de mDC e de pDC. Foi também observado um decréscimo da frequência de monócitos intermédios HLA-DR⁺. Tal sugere que ocorre um aumento da migração destas populações celulares para a sinóvia inflamada. As células mostravam também um maior grau de ativação, podendo esta estar associada à inflamação periférica, e os monócitos intermédios HLA-DR⁺ exibiram um perfil pró-inflamatório. A maioria das subpopulações estudadas apresentaram um aumento da expressão génica de IL-10, podendo tal corresponder a uma tentativa de regulação negativa da resposta inflamatória.

Os resultados obtidos sugerem alterações a nível fenotípico e funcional dos monócitos e DC na AR, que reforçam o envolvimento destas células na fisiopatologia da AR.

keywords

Rheumatoid arthritis, monocytes, dendritic cells, cytokines, CX3CR1

abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune chronic inflammatory disease, which attacks the joints and can lead to several systemic complications in the patients. To better understand this disease, it's important to study the several cells of the immune system involved in the physiopathology and progression of RA.

In this study, the role of monocyte and dendritic cells (DC) subsets in RA, important cells in the development and perpetuation of the inflammatory response, was assessed. Monocytes and DC migrate to the inflammation site, where they present antigens to T cells and secrete several soluble mediators, namely proinflammatory cytokines, contributing this way to the chronic inflammation observed in AR.

For this goal, 23 samples of peripheral blood from RA patients were analysed, in several stages of disease activity, together with 21 samples of healthy individuals (control group). The monocyte subsets (classical, intermediate HLA-DR⁺, intermediate HLA-DR⁺⁺ and non-classical monocytes) and DC subsets (myeloid (mDC) and plasmacytoid (pDC)) were quantified through the expression of specific markers by flow cytometry. Afterwards, the subsets were sorted (cell sorting) for the study of the genic expression of IL-10, IL-12p35 and TNF- α , and of CX3CR1, by qPCR.

The results showed a decrease of the number and frequency on non-classical monocytes, mDC and pDC in the group of RA patients. A decrease of the frequency of the intermediate HLA-DR⁺ monocytes was also observed. This suggests an increase of the migration of these cell subtypes to the inflamed synovium. The cells also showed greater activation in the patients with RA, which could be associated with the peripheral inflammation, and the intermediate HLA-DR⁺ monocytes had a more proinflammatory profile. Most of the subsets showed an increase in the genic expression of IL-10, which could be due to an attempt to downregulate the inflammatory response.

These results suggest alterations at the phenotypical and functional levels of monocytes and DC in RA, supporting the contribution of these cells to the physiopathology of RA.

Índice

Índice	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas	vii
Introdução	1
1. O sistema imunitário	1
1.1. Células do sistema imunitário	2
1.1.1. Monócitos	4
1.1.2. Células dendríticas	6
1.1.2.1. Subtipos de células dendríticas no sangue	8
1.2. Resposta inflamatória e citocinas	11
2. Artrite Reumatoide	13
2.1. Fisiopatologia da Artrite Reumatoide	13
2.1.1. Fatores genéticos e ambientais	15
2.1.2. Resposta autoimune e inflamação sinovial	17
2.1.3. Dano estrutural e complicações sistémicas	18
2.2. Critérios de classificação da AR	20
2.3. O papel dos monócitos e das células dendríticas na fisiopatologia da Artrite Reumatoide	21
3. Objetivos	24
Materiais e Métodos	25
1. Caracterização da amostra	25
2. Quantificação e caracterização fenotípica de monócitos, DC e suas subpopulações	25
3. Caracterização funcional de monócitos, DC e suas subpopulações	29
3.1. Separação celular das subpopulações por Citometria de Fluxo	29

3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA	30
3.3. Análise da expressão génica de citocinas por qPCR.....	30
4. Análise estatística	32
Resultados.....	33
1. Quantificação de monócitos, DC e suas subpopulações.....	33
1.1. Frequência das subpopulações de monócitos.....	33
1.2. Frequência das subpopulações de células dendríticas.....	35
2. Caracterização imunofenotípica das subpopulações de monócitos e células dendríticas.....	36
2.1. Expressão de CD14 e CD16.....	36
2.2. Expressão de CD33	37
2.3. Expressão de CD123	39
2.4. Expressão de HLA-DR.....	40
2.5. Expressão de CD68	40
2.6. Expressão de CD300e	41
3. Expressão génica de IL-10, IL-12p35, TNF- α e CX3CR1 nas subpopulações de monócitos e células dendríticas	42
3.1.1. Expressão génica de IL-10.....	42
4.1.1. Expressão génica de IL-12p35.....	42
4.1.2. Expressão génica de TNF- α	43
4.1.3. Expressão génica de CX3CR1	44
Discussão.....	47
Conclusões.....	51
Referências	53

Índice de Figuras

Figura 1. Hematopoiese. A célula estaminal hematopoiética (HSC) dá origem a progenitores mieloides e linfoides, que por sua vez originam todas as células do sistema imunitário, eritrócitos e plaquetas. Adaptado de (1).	3
Figura 2. Divisão de monócitos nas suas subpopulações de acordo com a sua expressão de CD14 e CD16. a) Divisão em 2 subpopulações, sendo o grupo 1 correspondente aos monócitos clássicos e o grupo 2 aos monócitos CD16 ⁺ . b) Divisão em 3 subpopulações, em que o grupo 1 corresponde aos monócitos clássicos, o grupo 2 aos monócitos intermédios e o grupo 3 aos monócitos não clássicos.	5
Figura 3. Função imunogénica e função tolerogénica das DC. A apresentação de auto-antígenos por DC imaturas poderá levar à tolerância imunológica de linfócitos T auto-reactivos. Por outro lado, a apresentação de antígenos por parte de DC ativadas leva à diferenciação de células T em células efectoras. Adaptado de (3).	7
Figura 4. Subtipos de DC presentes no sangue, tecidos epiteliais e nódulos linfáticos. As linhas a tracejado representam relação ainda não completamente definidas no organismo humano. GMP – progenitor dos granulócitos e macrófagos; LC – células de Langerhans. Adaptado de (4).	8
Figura 5. Relação da evolução da AR com a presença ou ausência de ACPA. A presença de ACPA correlaciona-se com uma doença mais ativa e mortal, lesões mais severas e maiores complicações sistémicas, comparativamente com a ausência deste anticorpo. Adaptado de (2).	14
Figura 6. Representação gráfica da estratégia utilizada para a identificação das diferentes populações de monócitos e DC: monócitos clássicos (laranja); monócitos intermédios HLA-DR ⁺ (azul claro); monócitos intermédios HLA-DR ⁺⁺ (azul escuro); monócitos não clássicos (roxo); mDC (verde claro); pDC (vermelho).	28
Figura 7. Correlação do número absoluto de monócitos clássicos ($y=240+28,3x$, $r^2=0,104$) com o índice DAS dos doentes com AR.	34
Figura 8. Correlação da percentagem total de mDC ($y=0,18-0,02x$, $r^2=0,151$) com o índice DAS dos doentes com AR.	35
Figura 9. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD14 e CD16 nos monócitos clássicos, intermédios DR ⁺ , intermédios DR ⁺⁺ , e não clássicos, no grupo controlo e no grupo de doentes.	36

Figura 10. Correlação da MIF de CD14 de monócitos clássicos ($y=23905-1382x$; $r^2=0,145$) com o índice DAS dos doentes com AR.	37
Figura 11. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD33 para as subpopulações de monócitos e para mDC no grupo controlo e no grupo de doentes.....	37
Figura 12. Correlação da MIF de CD33 de A) monócitos clássicos ($y=17223-2198x$; $r^2=0,187^*$), B) intermédios DR^+ ($y=14422-1980x$; $r^2=0,234^*$), C) intermédios DR^{++} ($y=14578-1763x$; $r^2=0,189^*$), e D) não clássicos ($y=4341-438,21x$; $r^2=0,119$), e de E) mDC ($y=17589-1973x$; $r^2=0,119$), com o índice DAS dos doentes com AR.	38
Figura 13. MIF de CD123 para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.	39
Figura 14. Correlação da MIF de CD123 de monócitos intermédios DR^+ ($y=719,65-70,72x$; $r^2=0,164$) com o índice DAS dos doentes com AR.	39
Figura 15. MIF de HLA-DR para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.	40
Figura 16. MIF de CD68 para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.	41
Figura 17. MIF de CD300e (IREM-2) para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.....	41
Figura 18. Expressão génica de IL-10 nos monócitos clássicos, intermédios $HLA-DR^+$, intermédios $HLA-DR^{++}$ e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.....	42
Figura 19. Expressão génica de IL-12p35 nos monócitos clássicos, intermédios DR^+ , intermédios DR^{++} e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.	43
Figura 20. Expressão génica de $TNF-\alpha$ nos monócitos clássicos, intermédios DR^+ , intermédios DR^{++} e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.	43
Figura 21. Correlação expressão génica de $TNF-\alpha$ por monócitos não clássicos ($y=0,32-0,042x$; $r^2=0,282^*$) com o índice DAS dos doentes com AR.	44
Figura 22. Expressão génica de CX3CR1 nos monócitos clássicos, intermédios DR^+ , intermédios DR^{++} e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.	45

Figura 23. Correlação da MIF de CX3CR1 de A) monócitos clássicos ($y=0,68+0,17x$; $r^2=0,138$), B) intermédios DR^+ ($y=0,17+0,07x$; $r^2=0,327^*$), e C) não clássicos ($y=0,20+0,04x$; $r^2=0,120$), com o índice DAS dos doentes com AR. 46

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características sociais e clínicas dos indivíduos pertencentes ao grupo de doentes em estudo.....	26
Tabela 2. Pannel de anticorpos monoclonais utilizados na marcação para aquisição da amostra por Citometria de Fluxo. O prefixo “cy-“ denota o anticorpo monoclonal intracitoplasmático utilizado.....	27
Tabela 3. Pannel de anticorpos monoclonais utilizados na marcação para separação celular das subpopulações por citometria de fluxo.	29
Tabela 4. Quantidades de reagentes utilizados para a síntese de cDNA a partir de RNA total, para uma reação, a partir do <i>RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	30
Tabela 5. Quantificação de monócitos e suas subpopulações em sangue total (percentagem e valor absoluto em nº de células/ μ L), e percentagem das subpopulações dentro dos monócitos.....	34
Tabela 6. Quantificação das subpopulações de DC (mDC – DC mieloides; pDC – DC plasmacitoides) em sangue total (percentagem e valor absoluto em nº de células/ μ L).	35

Lista de Abreviaturas

ACPA	<i>Anti-Citrullinated Protein Antibodies</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AINE	Anti-Inflamatórios Não Esteroides
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i>
AR	Artrite Reumatoide
ARA	<i>American Rheumatism Association</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDAI	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
cDNA	<i>complementary Desoxirribonucleic Acid</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CX3CR1	Recetor da Fractalcina
CYC1	<i>Cytochrome C-1</i>
DAS	<i>Disease Activity Score</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
ESR	<i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i>
EULAR	<i>The European League Against Rheumatism</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FcγRIII	<i>Fcγ Receptor type III</i>
FKN	<i>Fractalkine</i>
FR	Fator Reumatoide
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IREM-2	<i>Immune Receptor Expressed by Myeloid cells 2</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mDC	<i>Myeloid Dendritic Cell</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência

MLP	<i>Multilymphoid Progenitor</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
ODF	<i>Osteoclast Differentiation Factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RRN18S	<i>18S Ribosomal RNA</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
SDAI	<i>Simple Disease Activity Index</i>
SF3A1	<i>Splicing Factor 3 Subunit 1</i>
T_H	<i>T helper cell</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	<i>Regulatory T cell</i>
UBC	<i>Ubiquitina C</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Introdução

1. O sistema imunitário

O sistema imunitário é um conjunto de órgãos, células, moléculas e vias desenvolvido pelo nosso organismo para sua defesa, que cria respostas de defesa rápidas e específicas. Para exercer a sua função, o sistema imunitário possui três propriedades importantes: um vasto repertório de recetores de antígenos que permite o reconhecimento de uma gama quase infindável de agentes patogénicos; memória imunológica, que permite criar rápidas respostas imunitárias secundárias; e tolerância imunológica, para evitar danos imunológicos nos tecidos do próprio organismo (5).

A resposta imunitária é composta por dois tipos de resposta diferentes, mas ligados entre si: a resposta imunitária inata, e a resposta imunitária adquirida (1). As células envolvidas na resposta imunitária inata, como os macrófagos e células dendríticas (DC), reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP), presentes na superfície de microrganismos invasores, através de recetores de reconhecimento de padrões (PRR) (5). Após o reconhecimento e contacto com os microrganismos invasores, os macrófagos podem proceder à destruição direta desses agentes, através de processos como a fagocitose, ou participar, juntamente com as células dendríticas, no recrutamento da resposta imunitária adquirida. Este segundo tipo de resposta é caracterizado pela participação dos linfócitos T, que desempenham funções auxiliaadoras, efectoras e regulatórias, e dos linfócitos B, células produtoras de anticorpos (6). Ao contrário da resposta imunitária inata, a imunidade adquirida é altamente específica, devido aos recetores específicos para determinado antígeno expressos na superfície dos linfócitos (1). A partir do princípio de geração de diversidade, durante o desenvolvimento dos linfócitos B e T, ocorrem vários rearranjos nos genes que codificam para os recetores de antígenos, originando assim grupos de células que expressam várias cópias de um recetor específico para um único antígeno. Desta forma, a população de linfócitos pode, em teoria, reconhecer e responder contra qualquer antígeno.

Este potencial de reconhecimento de qualquer antígeno, embora necessário para a especificidade da imunidade adquirida, possui também vários riscos, nomeadamente a possibilidade de atacar o próprio organismo hospedeiro. Para evitar este caso, existem mecanismos de reconhecimento responsáveis por detetar e inibir ou destruir linfócitos que

reajam contra tecidos do hospedeiro, através de um processo de discriminação de antígenos do próprio organismo e antígenos estranhos (1). Este processo é denominado tolerância imunológica, e é aplicado durante o desenvolvimento das células T e B, pouco tempo após a produção dos receptores de antígenos gerados aleatoriamente. Embora este processo permita que o sistema imunitário distinga entre antígenos próprios e antígenos estranhos, pode por vezes resultar em consequências não intencionais em determinados casos, como a proliferação de células cancerígenas que expressam estruturas reconhecidas pelas células do sistema imunitário, de modo a que este reconheça as células tumorais como do próprio organismo, e portanto as ignore. Por outro lado, uma disfunção ou défice nos mecanismos de tolerância imunológica pode também levar a consequências clínicas, como as doenças autoimunes.

1.1. Células do sistema imunitário

Durante a resposta imunitária, as várias células deste sistema funcionam em harmonia de modo a garantir um ataque eficaz: as células da imunidade inata (monócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK e granulócitos) rapidamente criam uma primeira linha de defesa contra o agente patogénico, tentando eliminá-lo em poucas horas; caso a infeção persista, células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas, comunicam a informação sobre o agente infeccioso aos linfócitos B e T, coordenando assim a resposta imunitária adquirida, que entra em ação alguns dias após o aparecimento do agente patogénico; após o primeiro contacto com o agente, são geradas células de memória, que permitem uma resposta secundária bastante mais rápida caso a infeção ocorra novamente (1).

Todas as células do sistema imunitário, bem como os eritrócitos e as plaquetas, originam-se a partir de um progenitor comum, a célula estaminal hematopoiética (HSC), através de um processo denominado hematopoiese, que ocorre na medula óssea (1). A maioria das células passa pelo processo de maturação neste mesmo local; no entanto, algumas completam a sua maturação fora da medula óssea, como é o caso dos linfócitos T, que terminam este processo no timo, e dos macrófagos, que se diferenciam nos tecidos a

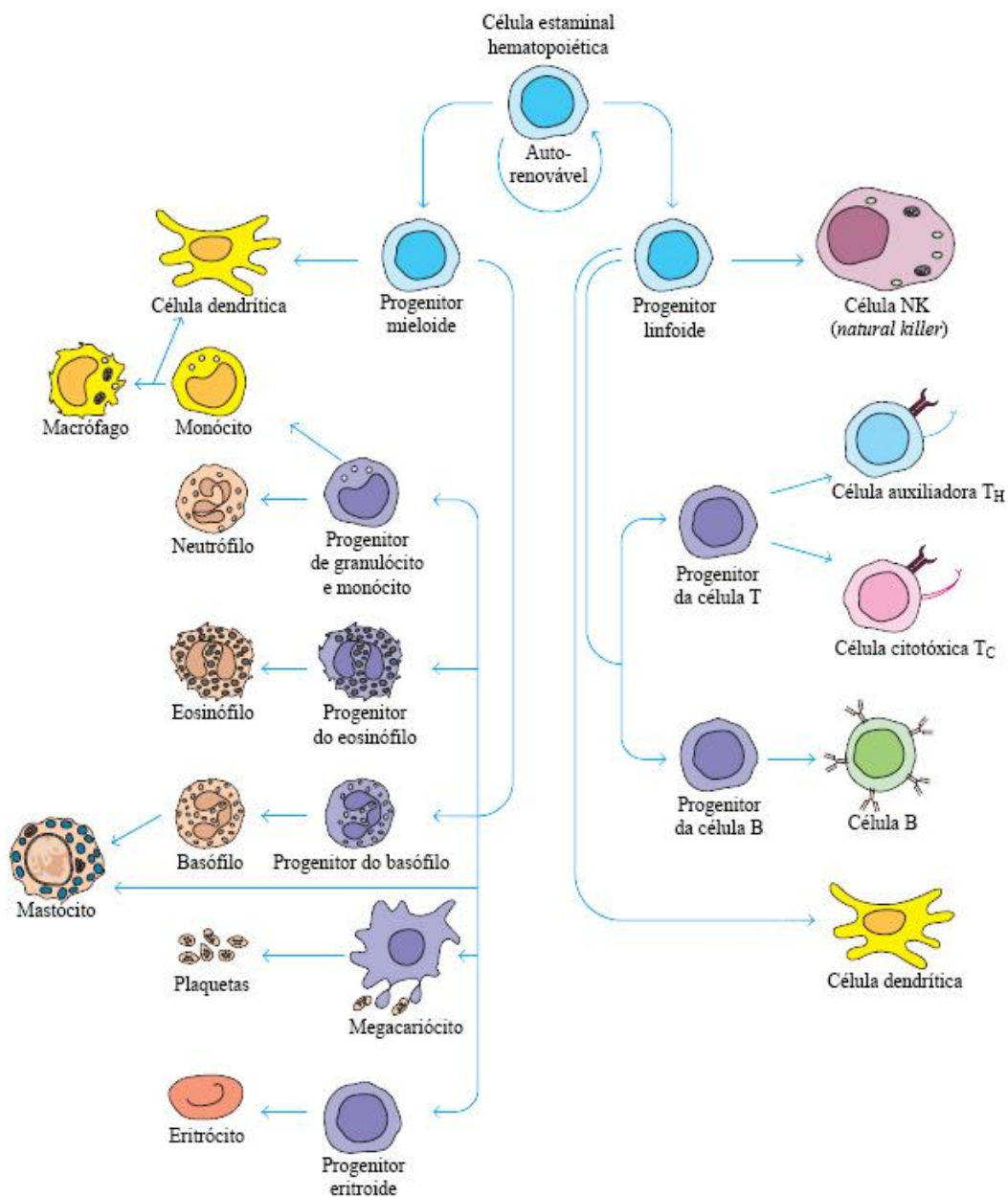


Figura 1. Hematopoiese. A célula estaminal hematopoiética (HSC) dá origem a progenitores mielóides e linfóides, que por sua vez originam todas as células do sistema imunitário, eritrócitos e plaquetas. Adaptado de (1).

partir de monócitos. Durante a hematopoiese, a HSC diferencia-se em dois progenitores de linhagens diferentes: um progenitor mielóide, que dá origem à maioria das células do sistema imunitário inato, nomeadamente monócitos, granulócitos e células dendríticas, bem como a eritrócitos e plaquetas; e um progenitor linfóide, que se pode diferenciar em linfócitos T e B, células NK, e um grupo específico de células dendríticas que será discutido mais adiante (1).

1.1.1. Monócitos

Os monócitos são leucócitos produzidos na medula óssea e libertados na corrente sanguínea, correspondendo a cerca de 5 a 10% dos leucócitos circulantes (1), e onde permanecem em circulação durante 2 a 3 dias (5). Durante esse tempo, estas células podem migrar para os tecidos, onde se podem diferenciar em macrófagos ou células dendríticas durante o estado normal para repor o número destas células no tecido, ou durante uma resposta do sistema imunitário (7). O recrutamento de monócitos durante uma resposta imunitária ou inflamatória é possível devido a moléculas de adesão presentes nas células endoteliais dos vasos capilares, que capturam o monócito e permitem que este adira ao endotélio vascular. As quimiocinas (moléculas que determinam o movimento e vias de circulação das várias células do sistema imunitário) que se encontram presentes no local de inflamação funcionam como sinalizadores, e os monócitos migram da corrente sanguínea para o tecido, onde finalmente se diferenciam em macrófagos ou em células dendríticas dependendo do estímulo recebido (8). Para além disso, estes leucócitos participam também nesta resposta através da libertação de várias citocinas, nomeadamente citocinas pró-inflamatórias, que desempenham um papel na perpetuação e na resolução da inflamação.

Os monócitos apresentam uma grande heterogeneidade no que toca à sua morfologia, principalmente em tamanho, granularidade e núcleo, bem como no seu fenótipo (9). Assim, podem ser divididos em subtipos de acordo com a expressão de moléculas expressas na sua superfície celular, que podem ser usadas como moléculas-alvo em técnicas de imunofenotipagem celular, como é o caso da citometria de fluxo.

Os monócitos começaram por ser divididos em dois subtipos, baseados na sua expressão de CD14, um recetor de LPS (lipopolissacarídeos presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas) que se encontra presente na superfície membranar dos monócitos, e de CD16, ou Fc γ RIII, um recetor de baixa afinidade para a região do fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina G (IgG) (9) (ver Figura 2a). Os monócitos que expressam uma grande quantidade de CD14 mas não expressam CD16 na sua membrana (CD14⁺⁺CD16⁻) são denominados monócitos clássicos, tendo sido o primeiro grupo de monócitos identificados e representando a grande maioria destas células no sangue (cerca de 85% dos monócitos circulantes totais (10)). Para além deste grupo, também foi identificado

um segundo subtipo de monócitos que expressam CD16 na sua superfície (monócitos CD16⁺), com características fenotípicas e funcionais distintas dos monócitos clássicos (11).

Através de estudos utilizando a técnica de citometria de fluxo, foi possível distinguir-se uma nova subpopulação dentro dos monócitos CD16⁺, levando à divisão destes em dois subtipos distintos. Assim, foi estabelecida uma nova nomenclatura para os três subtipos de monócitos: monócitos clássicos CD14⁺⁺CD16⁻; monócitos intermédios CD14⁺⁺CD16⁺; e monócitos não clássicos CD14^{+/-}CD16⁺⁺ ou CD14^{low/-}CD16⁺⁺ (o símbolo + denota uma expressão 10 vezes superior a um isótopo controlo, enquanto que o símbolo ++ denota uma expressão 100 vezes superior) (12) (Figura 2b). A nomenclatura de clássico, intermédio e não clássico resulta de uma relação aparente de desenvolvimento entre estas células; durante uma infeção, por exemplo, existe um aumento inicial de monócitos intermédios no sangue, seguido de um aumento dos monócitos não clássicos (12).

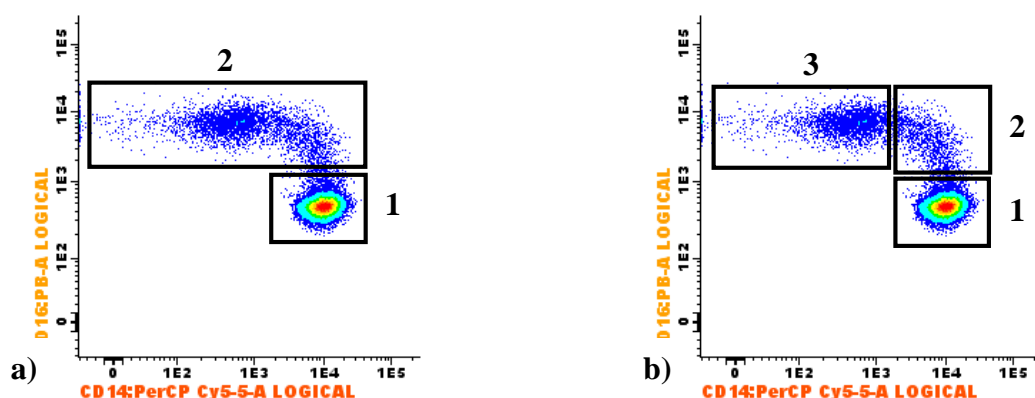


Figura 2. Divisão de monócitos nas suas subpopulações de acordo com a sua expressão de CD14 e CD16. **a)** Divisão em 2 subpopulações, sendo o **grupo 1** correspondente aos monócitos clássicos e o **grupo 2** aos monócitos CD16⁺. **b)** Divisão em 3 subpopulações, em que o **grupo 1** corresponde aos monócitos clássicos, o **grupo 2** aos monócitos intermédios e o **grupo 3** aos monócitos não clássicos.

Os monócitos clássicos correspondem a cerca de 85% dos monócitos totais circulantes, e parecem estar mais envolvidos em processos fagocitários do que os outros dois subtipos (10). Por outro lado, os monócitos intermédios, que representam apenas 5% dos monócitos totais (10), expressam os níveis mais elevados de moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe II, envolvidas no processamento e apresentação de antígenos, indicando que este subtipo poderá ser o mais relacionado com a estimulação de linfócitos T por apresentação de antígenos (13). Os monócitos não clássicos mostram um comportamento de patrulha dos vasos sanguíneos, desempenhando várias funções efetoras durante a resposta inflamatória (14), evidenciadas também pela grande produção de citocinas

pro-inflamatórias por este tipo de monócitos, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 β (IL-1 β) (13).

1.1.2. Células dendríticas

As células dendríticas (DC) são um grupo de células bastante diverso que se encontram no sangue, tecidos periféricos e órgãos linfoides. Estas células partilham entre si um conjunto de propriedades fenotípicas e funcionais semelhantes, nomeadamente a sua morfologia, capacidade de motilidade, expressão elevada de moléculas MHC de classe I e II e de moléculas co-estimulatórias, e especialização da sua função através de um processo denominado maturação (6). A sua principal função é o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T e B, sendo consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APC) do sistema imunitário.

Como referido anteriormente, as células progenitoras das DC na medula óssea ainda não se encontram claramente definidas, podendo estas ter uma linhagem mieloide ou linfoide (Figura 1). Um estudo recente (15) sugere um novo elemento na hierarquia hematopoiética, um progenitor multi-linfoide (MLP) capaz de dar origem a células B, T e NK, mas também células mieloides, como monócitos, macrófagos e DC, sendo assim diferente de um progenitor linfoide, que apenas origina células da linhagem linfoide. Este estudo argumenta também que o MLP é o principal progenitor das DC, ao contrário da ideia anterior de que o progenitor mieloide seria a fonte principal de DC (16). Para além do desenvolvimento das DC na medula óssea, estas células podem também ser derivadas a partir de monócitos; nomeadamente, os monócitos podem diferenciar-se em DC no intestino, baço e músculos (17).

No estado normal, as DC circulam no sangue ou residem nos tecidos ainda num estado imaturo, atuando como sentinelas imunológicas que reagem a agentes patogénicos ou moléculas estranhas ao organismo, bem como a sinais recebidos de outras células do sistema imunitário inato em casos como a resposta inflamatória. Estes sinais estimulam as DC a se diferenciarem em células maduras e especializadas no combate e transmissão da informação recebida aos linfócitos (18). Este processo de maturação leva a várias alterações nas características das DC. Fenotipicamente, as células passam a expressar níveis mais elevados de moléculas MHC de classe I e II e de recetores específicos das DC para a captura e processamento de antígenos, bem como de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80

e CD86 (18, 19). A maturação é também acompanhada de uma especialização da função das DC, que adquirem a capacidade de estimular linfócitos, em particular linfócitos T, para iniciar a imunidade adquirida. Para tal, ocorre uma mudança na atividade das DC, de uma célula envolvida na captura e processamento de antígenos para uma APC, com uma diminuição da endocitose e fagocitose de antígenos e um aumento da secreção de quimiocinas e citocinas, bem como um aumento da migração destas células para órgãos linfoides secundários, onde apresentam o antígeno capturado a células T específicas (18).

Como células efectoras, as DC têm a capacidade de interagir com os linfócitos e assim iniciar uma resposta imunitária adquirida, tendo assim uma função imunogénica. Dependendo do estímulo recebido e do tipo de ativação, as DC podem induzir respostas de células T_H1 (células T auxiliaadoras do tipo 1) ou T_H2 , células T $CD4^+$ produtoras de IL-17, células T citotóxicas, e células T reguladoras (Treg) (20). Podem também estar envolvidas na indução de tolerância imunológica, por exemplo, através da captura de auto-antígenos de células em apoptose e apresentação destes a células T na ausência de mediadores inflamatórios, possuindo assim também uma função tolerogénica (Figura 3) (21). Embora ainda não se compreenda plenamente o papel das DC na indução de tolerância, pensa-se que estas células desempenham um papel relevante tanto na tolerância central como na tolerância periférica (3).

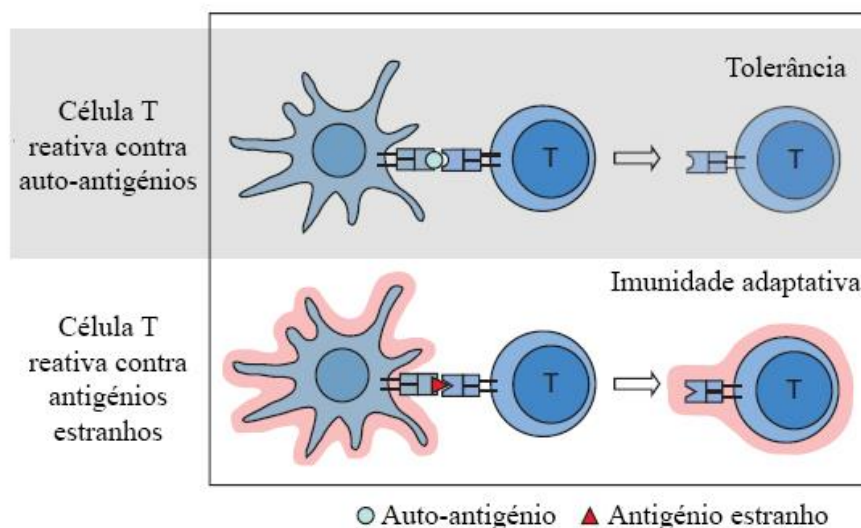


Figura 3. Função imunogénica e função tolerogénica das DC. A apresentação de auto-antígenos por DC imaturas poderá levar à tolerância imunológica de linfócitos T auto-reativos. Por outro lado, a apresentação de antígenos por parte de DC ativadas leva à diferenciação de células T em células efectoras. Adaptado de (3).

1.1.2.1. Subtipos de células dendríticas no sangue

Como referido anteriormente, as DC constituem um grupo heterogêneo de células presentes em diversos tecidos e órgãos do organismo. É possível dividir as DC em subtipos com base na sua localização, os seus progenitores, e a sua função (19). Na Figura 4 estão esquematizados os principais subtipos de DC que se encontram no sangue, tecidos e nódulos linfáticos. Neste trabalho, será dada especial atenção aos subtipos de DC presentes no sangue.

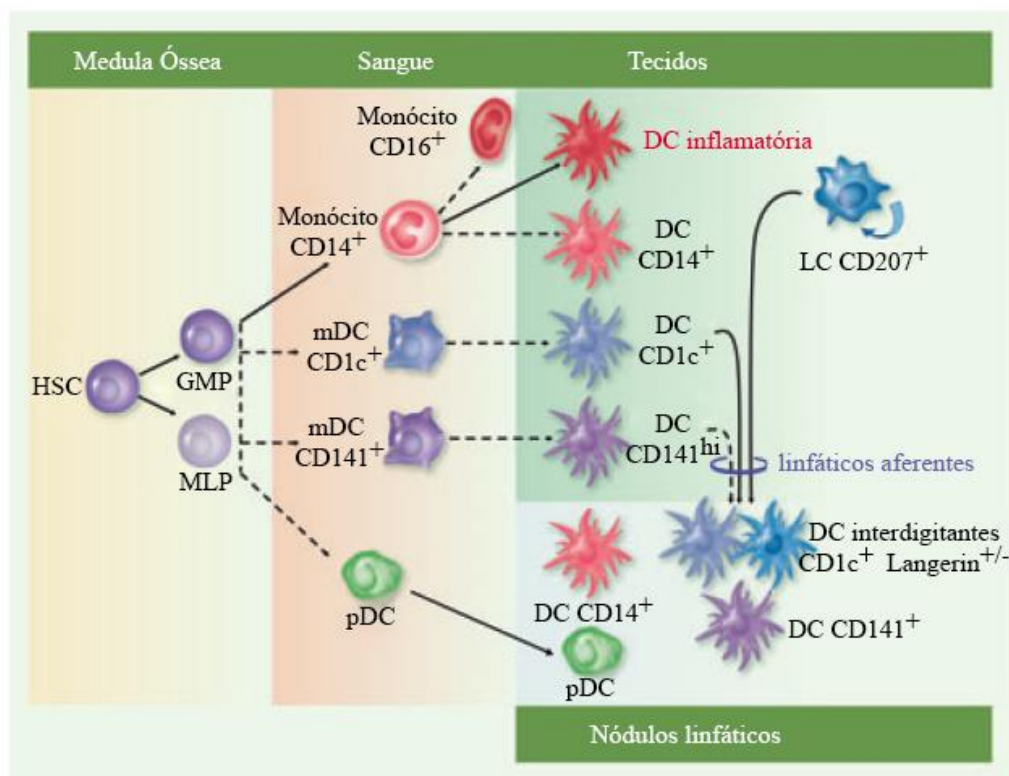


Figura 4. Subtipos de DC presentes no sangue, tecidos epiteliais e nódulos linfáticos. As linhas a tracejado representam relação ainda não completamente definidas no organismo humano. GMP – progenitor dos granulócitos e macrófagos; LC – células de Langerhans. Adaptado de (4).

No sangue, distinguem-se três subtipos de DC, as DC plasmacitoides (pDC) e dois subtipos de DC mieloides (mDC). Estas últimas apresentam em comum o facto de serem ambas positivas para moléculas MHC de classe II, nomeadamente HLA-DR, e negativas para marcadores de linhagem de outros leucócitos, como CD14 (monócitos), CD56 (marcador das células NK), CD3 (marcador dos linfócitos T), CD19 e CD20 (marcadores dos linfócitos B) (4, 12). Estas células do sangue diferem das DC nos tecidos em determinadas características morfológicas, como a falta de dendrites e marcadores de

maturação das DC, e funcionais, pois em princípio não estão envolvidas na apresentação de antígenos (12).

As mDC são células dendríticas que expressam marcadores associados à linhagem mieloide, como CD11b, CD11c, CD13 e CD33, e que, ao contrário dos monócitos, não expressam CD14 ou CD16, e podem ainda ser divididas em dois subgrupos de acordo com a sua expressão de CD1c⁺ e CD141⁺ (4, 12). Este tipo de DC não se restringe apenas ao sangue, existindo também nos tecidos periféricos e nos órgãos linfoides secundários, embora com características diferentes (22). Funcionalmente, as mDC do sangue são consideradas células sentinela imaturas que patrulham o organismo, capazes de passar pelo processo de maturação e ativar linfócitos T quando estimuladas *in vitro*, bem como células precursoras, devido à elevada expressão de certos marcadores mieloides, como o CD33 (12).

As mDC CD1c⁺ representam a maioria das mDC presentes no organismo, correspondendo a cerca de 1% dos leucócitos mononucleares (4). Este subtipo está envolvido na ativação de linfócitos T CD4⁺ naïve, e produz níveis elevados de IL-8, uma quimiocina envolvida no recrutamento de monócitos, granulócitos e linfócitos, bem como de outras citocinas, como IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IL-1 β , em resposta a diferentes estímulos (4, 23). São também capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T CD8⁺ através de uma via de apresentação restrita a moléculas MHC de classe I, num processo denominado apresentação cruzada de antígenos (24).

As mDC CD141⁺ constituem uma fração das mDC do sangue bastante inferior às mDC CD1c⁺, sendo cerca de 2 a 3% das DC do sangue (25), e 0.04% dos leucócitos mononucleares do sangue (26). Inicialmente, foi sugerido que este subtipo seria mais eficaz na apresentação cruzada de antígenos aos linfócitos T CD8⁺ comparativamente com os outros subtipos, com base na sua semelhança fenotípica com as DC CD8⁺ presentes no rato. Alguns estudos apoiaram esta proposta, mas o grupo de amostras analisado era muito pequeno, e a sua variabilidade ignorada (24, 27). Estudos subsequentes mostraram que as mDC CD1c⁺ também têm a capacidade de apresentar antígenos às células T CD8⁺, tendo a mesma eficácia que as mDC CD141⁺ na apresentação cruzada de antígenos em resposta a certos estímulos (27).

As pDC foram inicialmente identificadas como uma população de células com uma morfologia semelhante aos plasmócitos, mas capazes de produzir níveis elevados de interferão do tipo I, nomeadamente interferão- α (IFN- α) (17). Estas células desenvolvem-se

na medula óssea, e entram em circulação no sangue no seu estado imaturo, onde constituem cerca de 0,2 a 0,8% das células mononucleares (28). Fenotipicamente, as pDC distinguem-se das mDC pela expressão de CD123 e CD303 e baixos níveis de MHC II e de moléculas co-estimulatórias, e não expressam marcadores de linhagem mieloide e CD11c (4, 29).

As pDC podem ser ativadas por vários estímulos, incluindo vírus, componentes microbianos, e IL-3 e CD40L (22). A resposta mais característica destas células a estes estímulos é a produção elevada de IFN do tipo I, podendo esta ser até 100 vezes mais potente em comparação com outros tipos de células (30). Esta diferença na secreção de IFN entre as pDC e outras células poderá dever-se a várias características deste subtipo de DC, nomeadamente: a sua morfologia celular, com um retículo endoplasmático rugoso bastante extenso; expressão de IRF7, molécula reguladora da expressão de IFN; sinalização por recetores *toll-like* (TLR), uma classe de PRRs, particularmente TLR7 e TLR9, que são expressos nas pDC e não nas mDC; e recetores específicos das pDC, que ajudam a regular os níveis de IFN libertado (22, 29). A secreção de IFN tipo I leva à ativação de células do sistema imunitário tanto inato como adquirido, como outras células dendríticas, células NK, e linfócitos B e T (30).

Para além da produção de IFN, a ativação das pDC leva também à libertação de outras citocinas, como a TNF- α , e à maturação destas células, que adquirem assim a capacidade de apresentar antígenos a células T naïve, embora não com tanta eficácia como as mDC, principalmente no que toca a antígenos exógenos (31). Estas células podem também realizar a apresentação cruzada de antígenos através das moléculas MHC de classe I, particularmente de antígenos solúveis, virais e celulares (27). A apresentação de antígenos pelas pDC pode levar à iniciação da resposta imunitária através da ativação dos linfócitos T; por outro lado, pode também levar à indução de tolerância nestas células pela diferenciação de células Treg no local de infeção e assim controlar a resposta imunitária e prevenir uma situação de imunopatologia (31).

Devido à importância que as células dendríticas tomam na apresentação de antígenos tanto para iniciação da resposta imunitária como para indução de tolerância, vários estudos têm sido realizados para compreender o papel destas células em várias doenças e explorar o seu potencial em vacinas (22).

1.2. Resposta inflamatória e citocinas

Quando o sistema imunitário inato interage com um agente patogénico, ocorre a libertação de certos mediadores pelas células, nomeadamente citocinas e quimiocinas, que dão início a uma resposta inflamatória. Esta resposta desempenha três funções: aumenta o número de moléculas e células efetoras no local da infeção, para assim aumentar a potência da resposta imunitária; induz a coagulação do sangue a nível local, criando uma barreira que impede a propagação da infeção para a corrente sanguínea; e promove a reparação de tecidos danificados (8). Para conseguir estes objetivos, a inflamação leva a algumas mudanças nos vasos sanguíneos, que se refletem nos seus sintomas característicos (dor, rubor, calor, e tumescência). Assim, a resposta inflamatória leva a um aumento do diâmetro vascular, e consequentemente a um aumento do fluxo sanguíneo e a uma redução da velocidade deste. Além disso, ocorre também a ativação das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, de modo a que estas expressem moléculas de adesão celular e promovendo assim a ligação de leucócitos circulantes, bem como um aumento da permeabilidade vascular. Estas mudanças conduzem a um aumento da extravasão, isto é, migração de leucócitos para o local de infeção.

As citocinas são proteínas solúveis, de massa molecular baixa (10-20 kDa), que participam na regulação da resposta imunitária e inflamatória, estando envolvidas no recrutamento de leucócitos circulantes no sangue periférico, bem como na regulação do crescimento e ativação deste tipo de células (5, 32). À semelhança das hormonas, as citocinas podem ter uma ação autócrina (em que o alvo é a mesma célula que as produz), parácrina (quando influenciam células vizinhas), e endócrina (quando são libertadas para o sangue e entram em circulação, atuando em células mais distantes) (5). A maioria das citocinas atuam de forma parácrina ou autócrina (1).

As citocinas podem ser divididas em 6 famílias, de acordo com a sua estrutura e função: a família das citocinas IL-1; família das hematopoietinas, ou classe I; família dos interferões, ou classe II; família dos TNF; família da IL-17; e família das quimiocinas (1). Os membros da família da IL-1 são na sua maioria mediadores pró-inflamatórios, tal como os da família da IL-17, definida mais recentemente. As citocinas de classe I compõem a segunda maior família, agrupadas devido à sua estrutura, e estão envolvidas em diversos efeitos, como a proliferação e diferenciação de células do sistema imunitário e a secreção de anticorpos. As citocinas de classe II, por outro lado, estão envolvidas em respostas antivirais.

A família dos TNF pode induzir a apoptose ou sobrevivência das células, dependendo do seu ambiente fisiológico.

As quimiocinas são uma família de citocinas cuja função é a mobilização das células imunitárias de um órgão ou tecido para outro, através de um processo denominado quimiotaxia (1). Assim, estas moléculas são quimioatratoras, capazes de influenciar as proteínas do citoesqueleto e a expressão de moléculas de adesão das células alvo, permitindo a movimentação destas para regiões onde há uma maior concentração de quimiocinas. As quimiocinas podem ser divididas em várias classes com base na sua estrutura, nomeadamente pelo número de aminoácidos entre dois resíduos de cisteína da molécula. As duas maiores classes de quimiocinas são CXC e CC.

As citocinas desempenham um papel central na iniciação e resolução da resposta inflamatória, nomeadamente pela regulação da migração, diferenciação e polarização das células do sistema imunitário. A sua função como citocinas pró ou anti-inflamatórias depende da sua concentração local, do efeito combinado de outras citocinas presentes, e do estágio em que se encontra a resposta inflamatória (33). Como tal, são agentes importantes em doenças autoimunes e autoinflamatórias, como é o caso da artrite reumatoide, em que o sistema imunitário ataca o próprio organismo. Nestes casos, as citocinas podem influenciar a perpetuação da resposta inflamatória e assim participar na patogénese da doença.

2. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune, multifatorial, que afeta cerca de 1% da população mundial; estima-se que, em Portugal, cerca de 40 mil pessoas sofrem desta doença (34). A AR é caracterizada por uma resposta autoimune que desencadeia a inflamação na membrana sinovial (tecido conjuntivo que reveste várias articulações do corpo), levando conseqüentemente à destruição da cartilagem e do osso e a várias complicações sistémicas, entre elas doenças cardiovasculares, pulmonares, e psicológicas.

Doentes com esta doença podem apresentar vários sintomas, tanto a nível local (articulações) como sistémico; estes sintomas incluem: nas articulações, dor, hiperplasia, rigidez e dificuldade na mobilização; e a nível sistémico, uma sensação geral de fadiga e mal-estar, perda de peso, e anemia, para além das complicações já previamente referidas. Quando não detetada a tempo, a AR pode provocar erosão e lesões permanentes nas articulações muito rapidamente, podendo estas consequências manifestarem-se ao fim de apenas um ano (35). Assim, torna-se importante conseguir detetar a doença o mais rapidamente possível, a fim de se proceder a um tratamento intensivo e adequado do paciente, para se poder prevenir o desenvolvimento de lesões adicionais.

Para se poder desenvolver terapias contra a artrite reumatoide, e prever e prevenir esta doença, é necessário ter-se um conhecimento aprofundado de como esta se desenvolve, bem como dos vários fatores e células do sistema imunitário envolvidos na sua fisiopatologia.

2.1. Fisiopatologia da Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide é considerada uma doença autoimune devido à presença de auto-anticorpos no soro de quase todos os doentes. O primeiro auto-anticorpo a ser detetado foi o fator reumatoide (FR), em meados do século XX, estando presente em cerca de 80% dos doentes com artrite reumatoide (36). Este anticorpo liga-se à região Fc de imunoglobulinas, particularmente a Imunoglobulina G, e a sua presença está relacionada com um curso de doença mais agressivo. No entanto, o fator reumatoide não é específico para a AR, estando presente também em 5% da população saudável, e podendo também ser encontrado em outras doenças, como lúpus, hepatite B, e tuberculose, entre outras (37). Embora o FR não possa servir como teste de triagem para a AR, pode servir como base para o prognóstico da doença.

Existem outros auto-anticorpos que podem ser encontrados no soro de doentes com AR. Destes, os anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA) têm sido considerados como tendo um papel cada vez mais relevante, estando presentes em mais de 70% dos doentes com AR (38). Diversos estudos mostram que ACPA é mais sensível e mais específico para AR do que o fator reumatoide, não sendo geralmente detetado noutras doenças, e sendo portanto mais útil para diagnóstico da AR (38-40). Uma característica importante dos ACPA é que podem ser detetados no soro de doentes anos antes do início das manifestações clínicas da doença, podendo assim ter um potencial preditivo da doença e permitindo o diagnóstico da doença antes de esta atingir uma fase mais tardia e severa (41, 42). O FR é também detetado antes do desenvolvimento da AR; no entanto, não tem um valor preditivo tão elevado como ACPA (41). A presença ou ausência de auto-anticorpos, principalmente de ACPA, leva a fenótipos distintos da AR tanto clínica como geneticamente, como evidenciado na Figura 5 (2). Em termos clínicos, a presença de ACPA está associada a um curso da doença mais agressivo, com uma atividade e mortalidade mais elevada do que no caso de ausência deste auto-anticorpo, e a lesões de nível mais severo observadas em exames radiológicos, bem como complicações sistémicas mais marcadas (43). No entanto, embora o curso da doença seja aparentemente diferente, doentes positivos para ACPA apresentam sinais e sintomas clínicos semelhantes a doentes negativos para este auto-anticorpo (44).

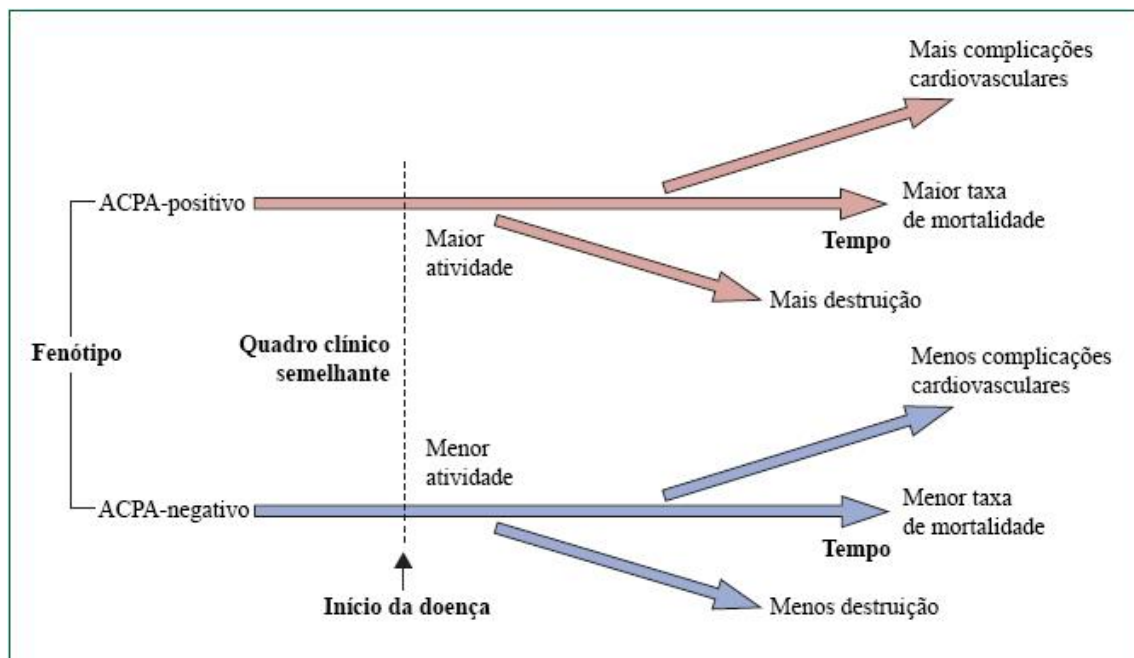


Figura 5. Relação da evolução da AR com a presença ou ausência de ACPA. A presença de ACPA correlaciona-se com uma doença mais ativa e mortal, lesões mais severas e maiores complicações sistémicas, comparativamente com a ausência deste anticorpo. Adaptado de (2).

A presença de auto-anticorpos em doentes com AR levou à classificação desta doença como uma condição de autoimunidade. Para o desenvolvimento de uma resposta autoimune, são necessárias três condições (32). Primeiro, as células apresentadoras de antígenos devem expressar moléculas MHC que permitam apresentar o auto-antígeno em causa. Neste passo, a predisposição genética desempenha um papel bastante importante. Em segundo lugar, o indivíduo em questão deve produzir linfócitos T e, em alguns casos, linfócitos B, que sejam capazes de reconhecer o auto-antígeno e atuar contra este. Finalmente, é necessário que haja fatores ambientais, como infeções microbianas ou virais, que levem ao bloqueio dos mecanismos de tolerância que, em situações normais, permitem a eliminação dos linfócitos autorreativos. Assim, torna-se importante não só estudar as diferenças nas células do sistema imunitário, mas também os vários fatores de risco genéticos e ambientais que possam influenciar a suscetibilidade a esta doença autoimune.

2.1.1. Fatores genéticos e ambientais

A AR é uma doença complexa, onde vários fatores poderão estar envolvidos na suscetibilidade e desenvolvimento da doença. Estima-se que cerca de 60% da suscetibilidade à AR se deva a fatores de risco genéticos (45). Destes, o locus HLA-DR foi identificado como dos fatores de risco mais importantes, conferindo mais de um terço da suscetibilidade genética total (46). Foram já identificados vários outros genes de risco, como polimorfismos nos *loci* PTPN22 (47-49), STAT4 (50), TRAF1/C5 (51), e 6q23 (52).

Existe uma associação entre a suscetibilidade à AR e os alelos de HLA-DRB1, uma região polimórfica (com vários alelos presentes numa população) do locus HLA. Estes alelos têm em comum uma sequência de aminoácidos (QKRAA, QRRRA ou RRRRA), denominada epítopo partilhado, localizadas nas posições 70 a 74 da terceira região hipervariável da cadeia DR β (53). Estes resíduos fazem parte de uma α -hélice presente no local de ligação para apresentação de antígenos, podendo assim estar relacionados com o início da resposta autoimune. Este epítopo partilhado encontra-se fortemente associado com a suscetibilidade a artrite reumatoide positiva para FR e ACPA (54). De facto, pensa-se que os alelos de risco com epítopo partilhado estão relacionados com a presença de ACPA e o desenvolvimento destes anticorpos (55).

Considerando que nem toda a suscetibilidade à doença pode ser explicada através de fatores de risco genéticos, pensa-se que também os fatores ambientais desempenham um

papel importante na maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento desta situação patológica. Foram já identificados vários fatores de risco ambientais que influenciam a suscetibilidade à doença, como o fumo de tabaco, pó de sílica e outros pós derivados de minérios, óleos minerais, consumo elevado de cafeína, e mesmo o índice de massa corporal e influências hormonais (56-60). Fatores como o consumo de álcool ou o uso de contraceptivos orais poderão ter um efeito protetor; no entanto, não existe concordância na literatura quanto a este facto (60-63).

O tabagismo é o fator de risco ambiental mais bem estudado até agora (64, 65). Estudos mostram a sua grande influência na suscetibilidade à artrite reumatoide, em particular a associação da duração deste hábito com o aumento de risco de artrite reumatoide seropositiva (com presença de FR no sangue dos doentes) (65, 66), e a importância da interação deste fator com a predisposição genética, nomeadamente com os alelos de risco HLA que apresentam o epítipo partilhado. Um estudo demonstrou existir uma forte relação entre tabagismo e a presença de alelos de risco HLA-DRB1 com epítipo partilhado em doentes com artrite reumatoide seropositiva (67). Este estudo apresenta várias possibilidades quanto aos mecanismos que poderão estar por detrás da associação observada entre os dois fatores estudados: o fumo de tabaco poderá causar modificações nos potenciais auto-antígenos, como a citrulinização, ou transportar novos antígenos, que são depois apresentados aos linfócitos T por moléculas MHC classe II que possuem o epítipo partilhado; da mesma forma, substâncias presentes no fumo poderão atuar como adjuvantes, despoletando o sistema imunitário inato e causando assim o desenvolvimento da artrite reumatoide. Outro estudo confirmou esta relação entre tabagismo e presença de alelos de risco HLA em doentes positivos para ACPA, bem como uma suscetibilidade à doença mais de 20 vezes superior quando o indivíduo é portador de dois alelos de risco HLA-DR (68). Neste artigo, é apresentada uma hipótese para explicar a relação encontrada: a exposição a longo prazo ao fumo de tabaco induz a citrulinização de auto-antígenos presentes nos pulmões, despoletando assim uma resposta autoimune, preferencialmente em indivíduos portadores dos alelos de risco HLA-DR; esta resposta poderá ser iniciada anos antes das primeiras manifestações clínicas. Após esta primeira resposta, um segundo evento pode levar ao desenvolvimento de artrite não diferenciada; esta poderá ser temporária em indivíduos que não tenham sido ainda sujeitos a uma resposta autoimune contra proteínas citrulinadas, e, por outro lado, levar à artrite reumatoide crónica em indivíduos que passaram já pela primeira resposta autoimune.

Esta hipótese poderá assim revelar alguma etiologia da artrite reumatoide positiva para ACPA.

Assim, a predisposição genética, quando aliada à exposição a fatores de risco ambientais, pode despoletar uma resposta autoimune num indivíduo através da perda de tolerância a auto-antígenos pelas células do sistema imunitário.

2.1.2. Resposta autoimune e inflamação sinovial

A origem da resposta inflamatória observada nas articulações de doentes com artrite reumatoide ainda não é clara, havendo vários fatores que poderão estar relacionados com o início desta resposta, como infeções microbianas ou virais, eventos biomecânicos e neurológicos, e disfunção microvascular (69). O início da inflamação sinovial está ligado a vários eventos, como a hiperplasia e hipertrofia do tecido sinovial, edema, dano microvascular, neovascularização, e infiltração por células mononucleares, como macrófagos, linfócitos T e B, e células dendríticas (37). A expressão de moléculas de adesão por parte das células endoteliais e a exposição destas a várias citocinas levam a várias alterações nestas células, que facilitam a entrada de células do sistema imunitário no tecido, levando assim a uma perpetuação da inflamação da membrana sinovial, situação denominada por sinovite.

A angiogénese (processo de formação de novos vasos sanguíneos) é um dos eventos chave na perpetuação da inflamação crónica, sendo observada no *pannus*, que corresponde a uma camada anormal de tecido inflamado formada nas articulações afetadas pela doença, composto por várias células do sistema imunitário, vasos sanguíneos e células fibrosas, e que ocorre nos doentes com AR. Na artrite reumatoide, a sinóvia, ou membrana sinovial, é um ambiente caracterizado por uma situação elevada de hipoxia, que induz a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator de crescimento responsável pelo desenvolvimento da angiogénese (70). Este fenómeno é regulado por vários fatores indutores e inibidores, como fatores de permeabilidade, enzimas degradantes de matriz, mitogénios, e citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-15, e IL-18. Os novos vasos sanguíneos formados através da angiogénese fornecem nutrientes e oxigénio às células presentes na sinóvia e *pannus*, e promovem a migração de leucócitos circulantes no sangue periférico para o tecido, perpetuando assim a resposta inflamatória e consequentemente a situação de sinovite.

A migração de leucócitos para o tecido e fluido sinovial é responsável pelo aumento do seu número no local de inflamação, bem como a um aumento dos produtos libertados por estas células, como citocinas e quimiocinas. A produção e libertação destas moléculas parece estar relacionada com muitas das manifestações da AR, como a inflamação observada no tecido e fluido sinoviais, proliferação de células da sinóvia, dano na cartilagem e no osso, e várias complicações sistémicas consequentes da doença (37). O ambiente rico em citocinas e quimiocinas leva também à ativação de fenótipos característicos de várias células do sistema imunitário, como por exemplo os linfócitos T, que são ativados e se diferenciam em linfócitos T *helper* 17 (T_H17) por estimulação com interleucina 6 (IL-6). Estas células produzem vários mediadores da resposta inflamatória, principalmente IL-17, que estimulam a osteoclastogénese e a produção de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases (MMPs) por monócitos, macrófagos e fibroblastos, levando assim à perpetuação da inflamação sinovial e ao dano articular (71).

2.1.3. Dano estrutural e complicações sistémicas

O estado de inflamação crónica característico da AR leva, com o passar do tempo, à invasão da cartilagem e do osso adjacentes à sinóvia, promovendo assim a destruição articular, mediada pela atividade de osteoclastos, condrócitos e fibroblastos sinoviais (69). Os osteoclastos, particularmente, desempenham um papel importante na reabsorção óssea, e consequente erosão.

As células presentes no tecido sinovial inflamado, principalmente no tecido adjacente à superfície do osso, poderão ser uma fonte de fator de diferenciação de osteoclastos (ODF), bem como de células precursoras de osteoclastos, denominadas pré-osteoclastos. Além disso, a presença de fibroblastos sinoviais e linfócitos T ativados poderão levar à diferenciação de células da linha monócito e macrófago em osteoclastos (72).

Os osteoclastos são células multinucleadas que são responsáveis pela reabsorção óssea, através da degradação da matriz óssea, e que, em número elevado, levam à osteoporose, um dos eventos observados em doentes com AR. Numa situação normal, a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos é contrabalançada pela ação dos osteoblastos, que são responsáveis pela formação do osso. No entanto, esta ação está praticamente ausente em doentes com artrite reumatoide, devido a vários fatores, como a produção de TNF- α , que inibem a maturação e função dos osteoblastos nos locais de erosão óssea (73).

Existem várias citocinas envolvidas na degradação da cartilagem e do osso na AR. Por exemplo, a IL-1 β e, em menor grau, TNF- α induzem a expressão de MMPs e inibem a síntese de matriz, contribuindo assim para a degradação da cartilagem (69). Estas duas citocinas estão também envolvidas na indução da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e recrutamento de neutrófilos, que, através da libertação de proteases, levam à degradação de proteoglicano e, consequentemente, à precipitação de complexos imunes e à exposição de condrócitos, células envolvidas na degradação do tecido conetivo e portanto no dano articular observado na AR (71).

Ao nível esquelético, para além da erosão articular e óssea já abordada, a AR é caracterizada por osteopenia, isto é, perda da densidade mineral óssea, e osteoporose geral, uma doença óssea progressiva caracterizada por uma diminuição da massa e densidade óssea e que pode levar a fraturas (74). Certos grupos de doentes com AR, como mulheres em pós-menopausa (75), poderão ser mais afetados do que outros, devido à presença de outros fatores de risco que contribuem também para o aparecimento das condições ósseas mencionadas. A osteoporose está ligada a vários fatores, como a ativação de osteoclastos anteriormente mencionada, e o uso de corticosteroides na terapêutica, que afetam o metabolismo ósseo e, em concentrações mais elevadas, podem mesmo levar a fraturas no esqueleto (76, 77).

Os vários mediadores inflamatórios presentes nas articulações afetadas podem entrar em circulação no sangue, promovendo assim várias complicações a nível sistémico, principalmente a nível ósseo, cardiovascular, e neurológico. A AR encontra-se associada a um aumento de risco de doenças cardiovasculares, como enfarte do miocárdio (78), sendo estas um dos principais fatores de mortalidade da doença (79). O aumento de risco de doenças cardiovasculares em doentes com artrite reumatoide parece ser independente dos fatores de risco tradicionalmente associados a estas doenças, como idade, índice de massa corporal, tabagismo, diabetes *mellitus*, e hipercolesterolemia (80). Outros fatores podem contribuir para o aumento deste risco, como por exemplo a presença de citocinas circulantes produzidas nas articulações inflamadas, como é o caso do TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estas citocinas podem contribuir para a aterogénese, isto é, para a formação de placas ateromatosas, promover o stress oxidativo e a disfunção endotelial, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, e aumentar a resistência dos tecidos à insulina, aumentando o risco de diabetes e dislipidémia (81).

Existem outros tecidos que são afetados pelos mediadores inflamatórios libertados para a circulação durante o desenvolvimento da AR, como os olhos, pele, pulmões, rins, entre outros (74). Uma descoberta frequente em doentes com AR é a presença de uma anemia normocrómica normocítica, ou anemia das doenças crónicas, caracterizada por baixos níveis de ferro, afetando 33% a 60% dos doentes (82). Existe também um maior risco associado ao aparecimento de linfomas malignos e cancro do pulmão (83).

2.2. Critérios de classificação da AR

Numa tentativa de classificação de doentes com AR, em 1987, um comité do Colégio Americano da Reumatologia (ACR, previamente conhecido como Associação Americana do Reumatismo, ARA) (84) estabeleceu critérios de classificação a partir da revisão de critérios estabelecidos anteriormente e do estudo e análise de doentes com artrite reumatoide, quando comparados a um grupo de controlo. No total, foram definidos 7 critérios: rigidez matinal, artrite em três ou mais áreas articulares (num total de 14 áreas possíveis), artrite em pelo menos 1 articulação da mão, artrite simétrica, nódulos reumatoides, presença do auto-anticorpo fator reumatoide no soro do paciente, e alterações observada em exames radiológicos. Para um paciente ser diagnosticado com AR, este teria que apresentar pelo menos 4 dos 7 critérios.

Estes critérios de classificação foram amplamente utilizados para diagnosticar doentes até 2010, ano em que a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) (85) estabeleceu novos e melhorados critérios para esta doença. De facto, os critérios estabelecidos em 1987, embora adequados para definir a doença, não eram indicados para definir doentes num estado mais precoce de AR, uma classificação que se tornava cada vez mais necessária para os vários estudos em curso e o desenvolvimento de novas terapias com vista a prevenir a doença. Assim, estes novos critérios de classificação visam fundamentalmente o diagnóstico de novos doentes, que apresentem uma condição de sinovite em pelo menos uma articulação que não possa ser explicada por outra doença, atribuindo-lhes uma pontuação de 0-10 a partir de: envolvimento articular (apresentação de articulações inchadas ou sensíveis), serologia (presença de auto-anticorpos FR e/ou ACPA), reagentes de fase aguda (CRP e/ou ESR), e a duração de sintomas. É atribuída a classificação de “artrite reumatoide estabelecida” a doentes com uma pontuação igual ou superior a 6. Doentes com uma pontuação inferior, embora não possam ser classificados como tendo artrite reumatoide, poderão cumprir os

critérios numa altura mais tardia, e portanto não podem ser excluídos como possíveis doentes com AR.

Os critérios de classificação do ACR e da EULAR são indicados para o diagnóstico de novos doentes. No entanto, é também importante estabelecer uma classificação para a avaliação da atividade da doença e da resposta de um paciente a uma determinada terapêutica. Para tal, vários métodos foram já desenvolvidos, como: DAS (Índice da Atividade da Doença), baseado no índice de articulações de Ritchie, no número de articulações inchadas (num total de 44 articulações), na taxa de sedimentação eritrocitária e na saúde geral do paciente (86); DAS28, uma versão mais simples do DAS, que difere na utilização da contagem de 44 articulações, utilizando-se apenas 28 articulações neste caso, e do índice de Ritchie (87); SDAI (Índice Simplificado da Atividade da Doença), que envolve a contagem de articulações inchadas e sensíveis (num total de 28), avaliação global da atividade da doença pelo paciente e pelo médico, e níveis de proteína C reativa (88); e CDAI (Índice Clínico da Atividade da Doença), uma versão simplificada do SDAI, em que os níveis de proteína C reativa não são utilizados para a determinação da atividade da doença (89). Estes quatro índices foram recentemente comparados num estudo sistemático da literatura disponível (90), onde se concluiu que todos eles são válidos na avaliação da atividade da doença.

A classificação segundo o DAS28 tem especial relevo neste trabalho, pois é a partir desta que se irão categorizar os doentes estudados entre doentes com doença ativa e inativa. A partir da fórmula utilizada para calcular o DAS28, é atribuído um número entre 0 e 10 a cada paciente, indicando a atividade atual da doença. Se o valor do DAS28 for superior a 5.1, então a doença tem uma atividade alta; por outro lado, um valor inferior a 3.2 indica uma atividade baixa da doença. Caso o DAS28 esteja abaixo de 2.6, considera-se que o paciente se encontra em remissão (91).

2.3. O papel dos monócitos e das células dendríticas na fisiopatologia da Artrite Reumatoide

Vários estudos têm sido realizados para compreender o papel das células do sistema imunitário inato na fisiopatologia da AR (92), que parece estar continuamente ativado em doentes com AR, participando na perpetuação da situação inflamatória característica da doença.

Os monócitos e macrófagos assumem um papel fundamental no processo inflamatório. Durante este processo, os monócitos são recrutados para o local de inflamação, onde se diferenciam em macrófagos e participam na perpetuação ou resolução da resposta inflamatória. Na AR, os monócitos expressam marcadores de ativação e infiltram-se na membrana sinovial inflamada, contribuindo para a patogénese da doença através da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (93), e da diferenciação em osteoclastos, envolvidos na reabsorção e erosão óssea (94). Os monócitos interagem também com os linfócitos T, podendo este contacto levar ao desenvolvimento de células TH17, e ter consequências na destruição da cartilagem (94).

Têm sido realizados alguns estudos para avaliar e quantificar os vários subtipos de monócitos no sangue periférico de doentes com AR. Um primeiro estudo identificou uma maior frequência de monócitos CD16⁺ em indivíduos afetados pela doença, principalmente em casos de doença ativa (95). Este grupo de monócitos produz níveis elevados de TNF- α e IL-12 e níveis bastante baixos de IL-10, o que leva a crer que têm um papel mais pró-inflamatório do que os monócitos clássicos (11). Estudos subsequentes mostraram que este aumento da frequência de monócitos CD16⁺ corresponde de facto a um aumento dos monócitos intermédios (96, 97). Esta subpopulação apresenta uma menor expressão de marcadores de ativação, como CD45RA, o que poderá refletir a migração destes monócitos ativados para a sinóvia inflamada. Esta migração é possível devido às moléculas de adesão expressas nas células endoteliais e ao gradiente de quimiocinas libertadas no local de inflamação. Destas, destaca-se a fractalcina (FKN), a única quimiocina pertencente à classe CX3C, e que desempenha uma função dual como molécula de adesão e molécula quimioatratora (98). O recetor para esta quimiocina, CX3CR1, é expresso pelos monócitos, nomeadamente monócitos CD16⁺ (99). Na AR, a FKN está implicada não só na migração dos monócitos, como também na promoção da angiogénese e reabsorção óssea (100).

Tal como os monócitos, as células dendríticas estão implicadas na patogénese da AR, nomeadamente através do seu envolvimento na perda de tolerância imunológica, na apresentação de auto-antígenos, e na perpetuação da resposta inflamatória através da libertação de mediadores pró-inflamatórios (101). Estudos mostram uma diminuição do número de mDC e pDC no sangue periférico de doentes com AR, e um aumento destas na sinóvia inflamada (102-104), bem como um aumento da expressão de HLA-DR e de moléculas co-estimulatórias pelas mDC presentes neste local (104). Tal indica uma

extravasão das DC para o local de inflamação e um aumento da sua função, e apoia o seu potencial papel na patogénese da doença.

Para além do seu envolvimento na iniciação da resposta imunitária e perpetuação da inflamação, as DC poderão também participar na indução de tolerância, nomeadamente as pDC, que participam na diferenciação de Treg e exibem um fenótipo tolerogénico, sendo capazes de modular a resposta inflamatória em doentes com AR (105, 106). As DC capazes de induzir e manter a tolerância imunológica, DC tolerogénicas (tolDC), são consideradas uma estratégia promissora para a terapia de doenças autoimunes como a AR, e têm sido alvo de investigação recente, tendo sido feitos já alguns ensaios clínicos para testar o seu potencial na imunoterapia destas doenças (106, 107).

Existem várias moléculas que podem ser analisadas para uma melhor compreensão do estado de ativação e da função tanto de monócitos como de DC. Por exemplo, a molécula HLA-DR, envolvida na apresentação de antígenos a linfócitos T CD4⁺, encontra-se aumentada nos monócitos (97, 108) e mDC na sinóvia de doentes com AR, indicando um envolvimento destas células na estimulação da resposta das células T.

A molécula CD33 é um recetor transmembranar que se liga a oligossacarídeos que contenham ácido siálico e que funciona como molécula de adesão, sendo expressa principalmente em células mieloides (1). Pensa-se que esta proteína desempenha um papel importante na modulação da resposta imunológica, nomeadamente um papel inibitório, através da inibição da ativação e proliferação celular, da indução da apoptose, e da regulação da produção de citocinas, aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias e suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (109, 110).

Outras moléculas podem também ser utilizadas para avaliar o grau de ativação das células, como CD300e (recetor imune expresso por células mieloides, IREM-2), um recetor da família CD300 envolvido na regulação de respostas imunológicas e inflamatórias, e que é expresso apenas em células maduras da linhagem mieloides, estando presente maioritariamente nos monócitos CD14⁺⁺ e mDC (111). A sinalização através de CD300e leva à ativação dos monócitos e mDC, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , bem como um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e da sobrevivência das células (111, 112). No entanto, embora implicada na perpetuação da resposta inflamatória, ainda não foram realizados estudos sobre CD300e na AR.

3. Objetivos

Para este trabalho, estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- Quantificação e caracterização fenotípica das diferentes subpopulações de monócitos (monócitos clássicos, intermédios e não clássicos) e células dendríticas (DC mieloides e DC plasmacitoides) no sangue periférico de doentes com AR, e comparação destes resultados com um grupo controlo;
- Separação das várias subpopulações celulares para estudo da expressão génica, no mesmo grupo de doentes e de controlo, das citocinas TNF- α , IL-10, IL-12 e CX3CR1;
- Correlação dos resultados obtidos nas várias etapas com parâmetros de severidade da doença, nomeadamente a partir da classificação DAS28 dos doentes analisados.

Materiais e Métodos

1. Caracterização da amostra

No desenvolvimento deste trabalho, foram analisadas um total de vinte e três (23) amostras de sangue periférico de indivíduos com Artrite Reumatoide, seguidos no Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra e diagnosticados segundo os critérios de classificação da doença da Sociedade Americana de Reumatologia. O grupo de doentes com AR foi constituído por um total de 17 indivíduos do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com uma média de idades de $52,47 \pm 10,19$ anos e $51,17 \pm 8,08$ anos, respetivamente. Na Tabela 1 encontram-se as características clínicas do grupo de doentes em estudo.

O grupo controlo foi constituído por 14 indivíduos do sexo feminino e 4 indivíduos do sexo masculino, com uma média de idades de $44,9 \pm 9,5$ anos e $48,0 \pm 4,1$ anos, respetivamente, recrutados no Instituto Português do Sangue e Transplantação.

Todos os participantes foram devidamente informados acerca do estudo e assinaram um consentimento informado. Todas as amostras de sangue periférico foram colhidas num tubo com EDTA.

2. Quantificação e caracterização fenotípica de monócitos, DC e suas subpopulações

150 μ L de sangue periférico de um tubo com EDTA foram transferidos para um tubo de citómetro. De seguida, procedeu-se à marcação com os anticorpos monoclonais de superfície indicados na Tabela 2, excetuando o anticorpo monoclonal anti-CD68-FITC. O volume adicionado de cada anticorpo correspondeu ao volume recomendado pelo respetivo fabricante. O tubo foi posteriormente agitado no vórtex e incubado no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente, para se poder atingir as condições ótimas de ligação dos anticorpos à superfície das células e evitar a perda de fluorescência dos fluorocromos conjugados.

Tabela 1. Características sociais e clínicas dos indivíduos pertencentes ao grupo de doentes em estudo.

		Doentes com AR (n=23)
% sexo feminino		73,9
Idades (média ± desvio padrão)	Sexo masculino	51,17±8,08
	Sexo feminino	52,47±10,19
FR (%)		78,3
ACPA (%)		73,9
Tabagismo	% fumadores	21,7
	% ex-fumadores	8,70
DAS28 (média ± desvio padrão)		2,79±1,52
Prednisolona	%	73,9
	Dose média (mg/dia)	4,45±1,51
Metrotexato	%	78,3
	Dose média (mg/sem)	16,5±6,25
Salazopirina	%	34,8
	Dose média (mg/dia)	2375±518
Hidroxicloroquina	%	26,1
	Dose média (mg/dia)	400
AINE	%	56,5

Após esse tempo, adicionou-se 150 µL do reagente fixante (solução 1) do *kit* de fixação e permeabilização IntraPrep™ (Beckman Coulter, EUA), para fixar as células. Agitou-se o tubo vigorosamente no vórtex, e incubou-se novamente no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 2 mL de tampão fosfato-salino (PBS pH 7.4, 1x) (Gibco®, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) ao tubo, centrifugou-se o tubo durante 5 minutos a 1500 rpm e decantou-se o sobrenadante.

Para induzir a permeabilização dos leucócitos e lisar os eritrócitos presentes, adicionou-se 150 µL do reagente permeabilizante (solução 2) do *kit* IntraPrep™, e homogeneizou-se a mistura com cuidado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. De seguida, incubou-se no escuro durante 5 minutos, antes de adicionar o anticorpo monoclonal intracitoplasmático anti-CD68-FITC, procedendo-se de seguida a uma nova incubação durante 15 minutos.

Após este passo, procedeu-se a duas lavagens da amostra, adicionando-se para tal 2 mL de PBS (Gibco), homogeneizando-se e centrifugando durante 5 minutos a 1500 rpm, e finalmente decantando o sobrenadante. No final, ressuspendeu-se a amostra em 250 µL de PBS.

Tabela 2. Painel de anticorpos monoclonais utilizados na marcação para aquisição da amostra por Citometria de Fluxo. O prefixo “cy-“ denota o anticorpo monoclonal intracitoplasmático utilizado.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	País
Anti-CD14	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Cyanine 5.5</i> (PerCP-Cy 5.5)	M5E2	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-CD16	<i>Pacific Blue</i> (PB)	3G8	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-CD45	<i>Krome Orange</i> (KRO)	J.33	Beckman Coulter	Marselha, França
Anti-CD33	<i>R-Phycoerythrin Cyanine 7</i> (PeCy7)	D3HL60.251	Beckman Coulter	Marselha, França
Anti-CD123	<i>Allophycocyanin</i> (APC)	7G3	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-HLA-DR	<i>Allophycocyanin H7</i> (APC-H7)	G46-6	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-CD300e	<i>Phycoerythrin</i> (PE)	UP-H2	Immunostep	Salamanca, Espanha
Anti-cyCD68	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (FITC)	Ki-M7	An Der Grub	Viena, Áustria

Após a marcação intracitoplasmática, a amostra foi adquirida no citómetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, California, EUA), com recurso ao *software* FACSDiva 6.1.2 (BD Biosciences). Estabeleceu-se um mínimo de 400 000 eventos adquiridos por amostra.

Os resultados obtidos foram posteriormente analisados através do *software* Infinicyt™ 1.5 (Cytognos, Salamanca, Espanha), procedendo-se assim à identificação, quantificação e caracterização fenotípica das células em estudo. Na Figura 6 está representada a estratégia utilizada para a identificação das várias subpopulações de interesse. Utilizou-se o método indireto por hemograma para determinar o número de leucócitos totais em cada amostra de sangue periférico.

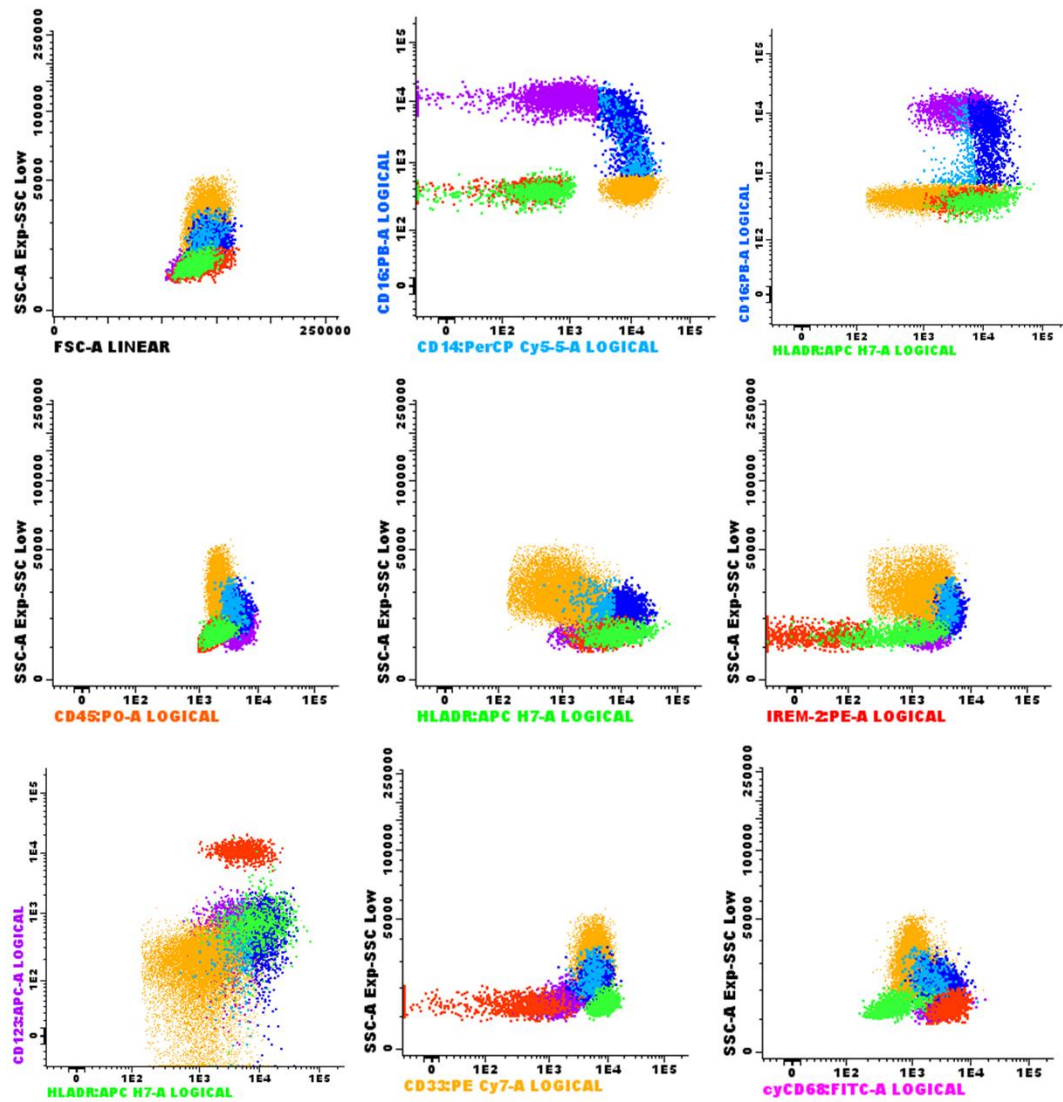


Figura 6. Representação gráfica da estratégia utilizada para a identificação das diferentes populações de monócitos e DC: monócitos clássicos (laranja); monócitos intermédios HLA-DR⁺ (azul claro); monócitos intermédios HLA-DR⁺⁺ (azul escuro); monócitos não clássicos (roxo); mDC (verde claro); pDC (vermelho).

3. Caracterização funcional de monócitos, DC e suas subpopulações

3.1. Separação celular das subpopulações por Citometria de Fluxo

Para a separação e purificação celular das várias subpopulações em estudo, foram transferidos 4 mL de amostra para um tubo de Falcon de 15 mL, e adicionou-se 10 mL de cloreto de amônia (NH_4Cl 0.155 M), deixando-se repousar na horizontal durante 20 minutos para a lise dos eritrócitos. De seguida, o tubo foi centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado.

Procedeu-se à marcação da amostra com os anticorpos monoclonais de superfície indicados na Tabela 3, adicionando-se a quantidade de cada anticorpo recomendada pelo respetivo fabricante. O tubo foi posteriormente agitado no vórtex e deixado a incubar no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Tabela 3. Painel de anticorpos monoclonais utilizados na marcação para separação celular das subpopulações por citometria de fluxo.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Clone	Marca	País
Anti-CD14	PerCP-Cy 5.5	M5E2	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-CD16	PE	3G8	Beckman Coulter	Marselha, França
Anti-CD45	KRO	J.33	Beckman Coulter	Marselha, França
Anti-CD33	PeCy7	D3HL60.251	Beckman Coulter	Marselha, França
Anti-CD123	APC	7G3	BD Pharmingen	San Diego, California, EUA
Anti-HLA-DR	FITC	Immu-357	Beckman Coulter	Marselha, França

Após esse tempo, o tubo foi novamente centrifugado durante 5 minutos a 1500 rpm, e descartou-se o sobrenadante. De seguida, ressuspenderam-se as células em cerca de 1 mL de PBS 1x (Gibco).

A separação celular foi efetuada com recurso a um citómetro de fluxo FACS Aria™ II (BD Biosciences). Centrifugou-se posteriormente cada fração obtida durante 5 minutos a 2000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 350 µL de tampão de lise RLT (Qiagen, Maryland, EUA).

3.2. Extração de RNA total e síntese de cDNA

A amostra foi transferida para um tubo de 2 mL livre de RNases. A extração do RNA total foi realizada com o *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) e com recurso ao QIAcube (Qiagen), de acordo com as instruções do fornecedor.

Após extração, realizou-se a síntese de cDNA das subpopulações de células dendríticas através do *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* #K1622 (Thermo Scientific, Lafayette, Colorado, EUA), adicionando-se, para cada fração, as quantidades de reagentes indicadas na Tabela 4, juntamente com 8 µL de RNA total. A síntese de cDNA das subpopulações de monócitos foi realizada com recurso ao *kit iScript™ Reverse Transcription Supermix* #170-8841 (Bio-Rad, Califórnia, EUA), adicionando-se, para cada fração, 4 µL de iScript RT Supermix, 8 µL de água livre de nucleases, e 8 µL de RNA total.

Tabela 4. Quantidades de reagentes utilizados para a síntese de cDNA a partir de RNA total, para uma reação, a partir do *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*.

Reagente	Quantidade
Primer “Random Hexamer”	1 µL
Primer Oligo (dT) ₁₈	1 µL
H ₂ O livre de nucleases	2 µL
Tampão de reação 5x	4 µL
Inibidor de RNases RiboLock	1 µL
Mix de dNTP 10 Mm	2 µL
Transcriptase reversa (RT) RevertAid M-MuLV (200 U/ µL)	1 µL
Volume total	12 µL

De seguida, os tubos foram agitados brevemente para homogeneização, e incubados no termociclador *DNAEngine© Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad) de acordo com o seguinte programa: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C, 10 minutos a 85°C. No final, o produto da síntese foi armazenado a -20°C.

3.3. Análise da expressão génica de citocinas por qPCR

Utilizou-se a técnica de PCR em tempo real para a quantificação relativa da expressão génica de citocinas por parte de cada subpopulação em estudo. Antes da preparação das

reações, diluiu-se a amostra de cDNA por um fator de 1.6x, adicionando-se para tal 12 µL de H₂O livre de nucleases aos 20 µL de cDNA.

Para cada reação de qPCR, foram adicionados 5 µL de *QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix* 1x (Qiagen), 1 µL de *QuantiTect Primer Assay* 1x (Qiagen) ou 0,5 µL de *forward primer* e 0,5 µL de *reverse primer* da TIB-MolBiol (Berlim, Alemanha), equivalente ao primer a testar, 1 µL de H₂O livre de nucleases e 3 µL de amostra. Os *primers* utilizados da QuantiTect foram IL-10 (QT00041685) e IL-12A (QT00000357), e da TIB-MolBiol RTTNF-AF (5'-TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA -3'), RTTNF-AR (5'- TCA GCC ACT GGA GCT GCC -3'), RTCX3CR1F (5'- TGA CTG GCA GAT CCA GAG GTT -3') e RTCX3CR1R (5'- TTC TGT CAC TGA TTC AGG GAA CTG -3') (113). A placa de qPCR foi posteriormente agitada e centrifugada brevemente.

As reações foram efetuadas no instrumento LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), seguindo o programa: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (ativação), 50 ciclos de 10 segundos a 95°C (desnaturação), 20 segundos a 55°C (*annealing*) e 30 segundos a 72°C (extensão), e 1 ciclo para a curva de *melting*, e finalmente 1 ciclo de 10 segundos a 40°C para arrefecimento. Após a reação, os resultados foram analisados com recurso ao *software* LightCycler® 480 v1.5 (Roche Diagnostics).

Para a normalização dos dados, foram escolhidos dois genes de referência para cada subpopulação com recurso ao *software* geNorm v3.4 (*Ghent University Hospital, Center for Medical Genetics*, Bélgica). Todos os genes de referência testados foram QuantiTect Primer Assay 1x (Qiagen). Os genes de referência escolhidos para os monócitos clássicos foram CYC1 (QT00209454) e RRN18S (QT00199367), para os monócitos intermédios DR⁺ e DR⁺⁺ SF3A1 (QT00061257) e CYC1, para os monócitos não clássicos UBC (QT00234430) e RRN18S, para as mDC UBC e SF3A1, e para as pDC RRN18S e SF3A1.

A quantidade relativa de cada gene foi calculada a partir do método ΔC_T , assumindo-se uma eficácia de 2. A normalização do gene foi calculada a partir da fórmula $\frac{\text{quantidade relativa}}{\text{fator de normalização}}$, tendo-se utilizado o *software* geNorm para determinar o fator de normalização a partir dos genes de referência escolhidos.

4. Análise estatística

A análise e tratamento estatístico dos dados obtidos foi feita através do *software* IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM, Nova Iorque, EUA). Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para determinar se havia significado estatístico na comparação entre o grupo controlo e o grupo de doentes em estudo. Para a correlação dos resultados obtidos com o índice DAS dos doentes, utilizou-se o coeficiente de Pearson para testar o seu significado estatístico. A comparação dos dados de amplificação (presença ou ausência de amplificação do gene) foi realizada através do teste de χ^2 .

Os resultados apresentados estão expressos como média \pm desvio padrão. Para as correlações, considerou-se haver uma correlação forte para coeficientes entre 0,7 e 1, moderada para coeficientes entre 0,5 e 0,7, e fraca para coeficientes entre 0,3 e 0,5. Para coeficientes inferiores a 0,3, considerou-se não haver uma correlação linear. Considerou-se uma diferença estatisticamente significativa quando o *p-value* correspondente era inferior a 0.05 ($p < 0,05$).

Resultados

1. Quantificação de monócitos, DC e suas subpopulações

1.1. Frequência das subpopulações de monócitos

Atualmente, é possível identificar-se vários subtipos de monócitos com base nas moléculas expressas por estes tanto a nível membrana como intracelular. Neste trabalho, foram identificadas e caracterizadas quatro subpopulações de monócitos com base na sua expressão de CD14, CD16 e HLA-DR, como referido anteriormente, tendo-se procedido à quantificação destas subpopulações no sangue periférico de um grupo de doentes com AR e de um grupo controlo. Assim, identificaram-se as seguintes populações: monócitos clássicos ($CD14^{++}/CD16^{-}/HLA-DR^{+}/CD33^{+}/CD123^{-}/IREM-2^{+}/CD68^{+}$); monócitos intermédios ($CD14^{+}/CD16^{+}/CD33^{+}/CD123^{dim}/IREM-2^{++}/CD68^{++}$), divididos segundo a sua expressão de HLA-DR em monócitos intermédios $HLA-DR^{+}$ e $HLA-DR^{++}$; e monócitos não clássicos ($CD14^{-}/CD16^{++}/HLA-DR^{+}/CD33^{dim}/CD123^{+}/IREM-2^{+}/CD68^{++}$).

Através da análise da Tabela 5, onde se registaram os resultados obtidos, observou-se que a frequência e valor absoluto de monócitos não clássicos encontram-se diminuídos no sangue periférico de doentes com AR em comparação com controlos saudáveis, bem como a sua percentagem dentro dos monócitos totais, sendo essas diferenças estatisticamente significativas. Também o valor absoluto da subpopulação de monócitos intermédios $HLA-DR^{+}$ se encontrava diminuído, comparativamente ao grupo controlo. Pelo contrário, a frequência relativa de monócitos clássicos encontrava-se aumentada no grupo de doentes.

Quando se analisou os vários parâmetros para os monócitos e cada subpopulação em função do índice DAS dos doentes, foi encontrada uma correlação fraca positiva entre o número absoluto de monócitos clássicos e a atividade da doença, representada no gráfico da Figura 7.

Tabela 5. Quantificação de monócitos e suas subpopulações em sangue total (percentagem e valor absoluto em nº de células/ μ L), e percentagem das subpopulações dentro dos monócitos.

			Controlos	Doentes
Monócitos	Total	%	6,78 \pm 1,87	5,97 \pm 1,53
		cél/ μ L	394,62 \pm 101,47	432,38 \pm 157,31
	Clássicos	%	5,58 \pm 1,58	4,89 \pm 1,49
		% subtipo	83,06 \pm 3,35	86,59 \pm 4,33*
		cél/ μ L	310,56 \pm 65,94	329,58 \pm 136,75
	Intermediários DR ⁺	%	0,090 \pm 0,036	0,050 \pm 0,032*
		% subtipo	1,37 \pm 0,34	1,27 \pm 0,99
		cél/ μ L	5,67 \pm 2,38	9,23 \pm 9,88
	Intermediários DR ⁺⁺	%	0,28 \pm 0,11	0,26 \pm 0,078
		% subtipo	4,51 \pm 1,51	5,52 \pm 1,83
		cél/ μ L	18,02 \pm 7,73	20,97 \pm 8,99
	Não clássicos	%	0,77 \pm 0,28	0,41 \pm 0,22*
		% subtipo	11,42 \pm 2,82	7,49 \pm 3,28*
		cél/ μ L	42,51 \pm 14,16	31,82 \pm 18,08*

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

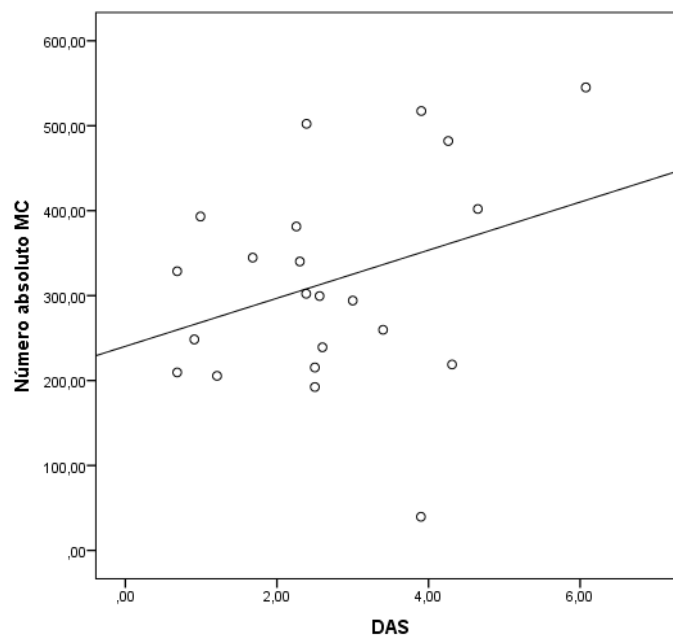


Figura 7. Correlação do número absoluto de monócitos clássicos ($y=240+28,3x$, $r^2=0,104$) com o índice DAS dos doentes com AR.

1.2. Frequência das subpopulações de células dendríticas

As células dendríticas podem ser classificadas em inúmeros subtipos consoante o seu fenótipo, a sua localização e a sua função. Para este trabalho, foram consideradas as duas grandes subpopulações de DC circulantes no sangue periférico, DC mieloides ($CD14^-/CD16^-/HLA-DR^{++}/CD33^{++}/CD123^{dim}/IREM-2^{dim}/CD68^{dim}$) e plasmacitoides ($CD14^-/CD16^-/HLA-DR^+/CD33^-/CD123^{++}/IREM-2^-/CD68^{++}$).

Pela análise da Tabela 6, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da frequência e valor absoluto, para as duas populações de DC, no grupo de doentes comparativamente com o grupo controlo. Por outro lado, quando analisados em função do índice DAS de cada doente, apenas a percentagem de mDC mostrou uma correlação negativa fraca com a atividade da doença, como evidenciado no gráfico da Figura 8.

Tabela 6. Quantificação das subpopulações de DC (mDC – DC mieloides; pDC – DC plasmacitoides) em sangue total (percentagem e valor absoluto em nº de células/ μ L).

			Controlos	Doentes
Células Dendríticas	mDC	%	0,22 \pm 0,11	0,13 \pm 0,074*
		cél/ μ L	13,01 \pm 6,41	8,59 \pm 4,98*
	pDC	%	0,14 \pm 0,045	0,074 \pm 0,035*
		cél/ μ L	8,26 \pm 1,99	4,89 \pm 1,93*

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

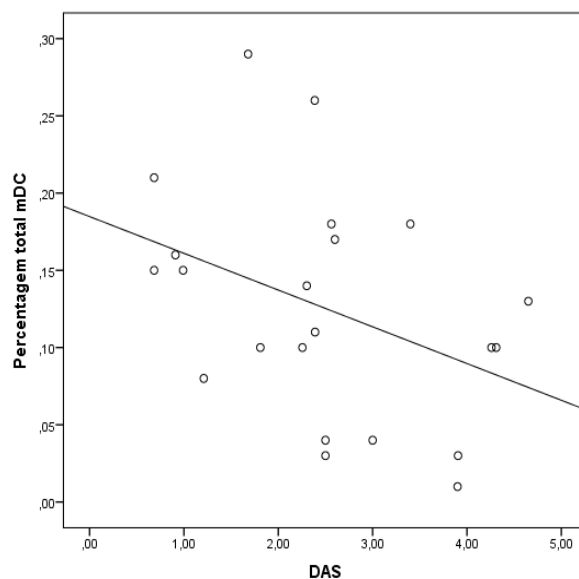


Figura 8. Correlação da percentagem total de mDC ($y=0,18-0,02x$, $r^2=0,151$) com o índice DAS dos doentes com AR.

2. Caracterização imunofenotípica das subpopulações de monócitos e células dendríticas

2.1. Expressão de CD14 e CD16

A expressão de CD14 e CD16 foi determinada através da média de intensidade de fluorescência (MIF). Os resultados encontram-se representados na Figura 9, tendo-se observado um aumento estatisticamente significativo da expressão de CD14 no grupo de doentes para todas as quatro subpopulações de monócitos.

Relativamente à correlação entre a expressão de CD14 e CD16 e a atividade da doença, apenas foi encontrada uma correlação fraca e não significativa entre a expressão de CD14 nos monócitos clássicos e o índice DAS, como representado na Figura 10.

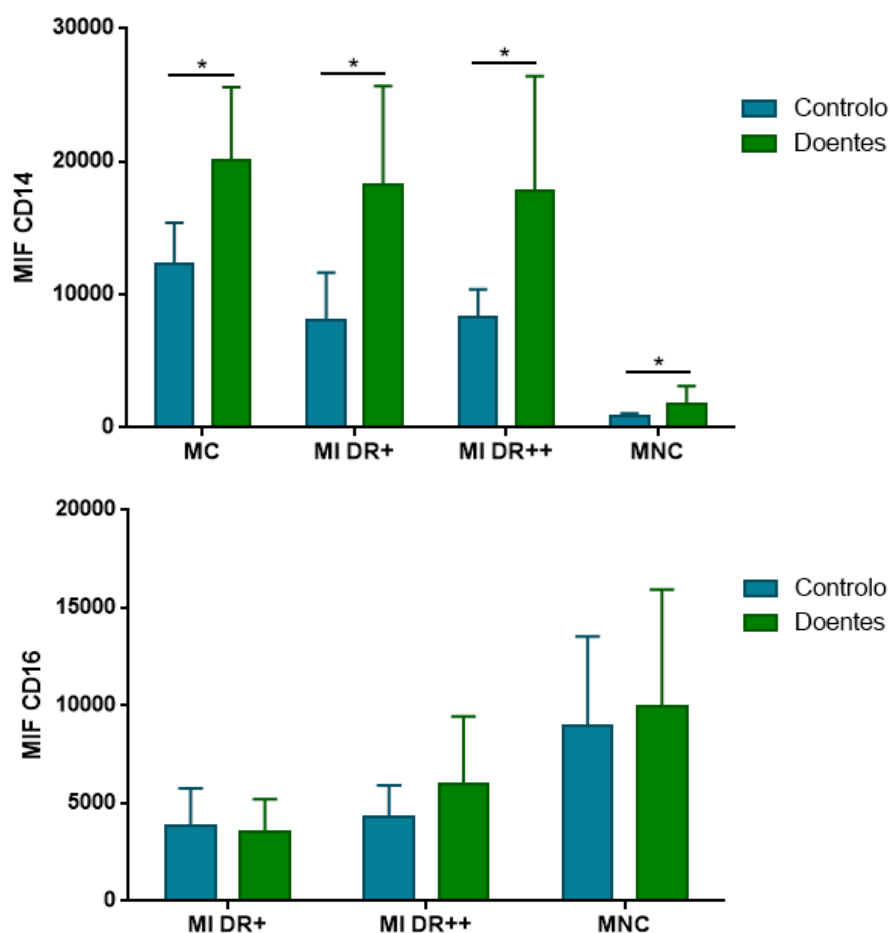


Figura 9. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD14 e CD16 nos monócitos clássicos, intermédios DR⁺, intermédios DR⁺⁺, e não clássicos, no grupo controlo e no grupo de doentes.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

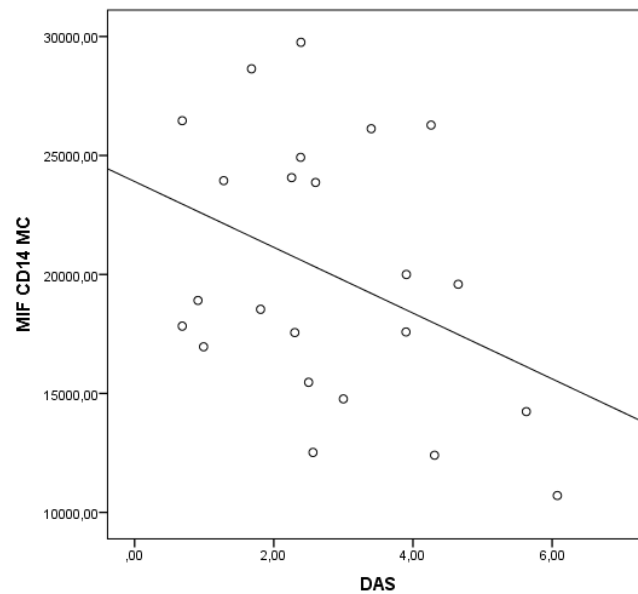


Figura 10. Correlação da MIF de CD14 de monócitos clássicos ($y=23905-1382x$; $r^2=0,145$) com o índice DAS dos doentes com AR.

2.2. Expressão de CD33

A expressão de CD33 nas subpopulações de monócitos e DC encontra-se representada na Figura 11. Para esta molécula, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

A correlação da MIF de CD33 das várias subpopulações celulares com o índice DAS dos doentes com AR está representada na Figura 12. Em geral, há uma correlação negativa entre os dois parâmetros.

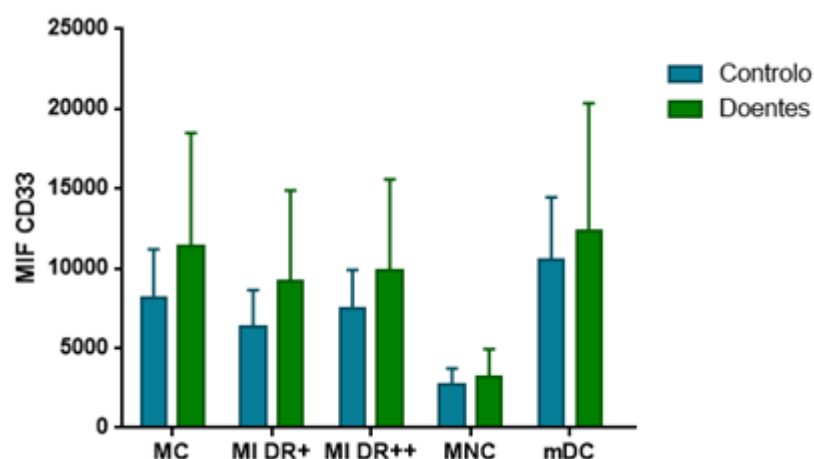


Figura 11. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD33 para as subpopulações de monócitos e para mDC no grupo controlo e no grupo de doentes.

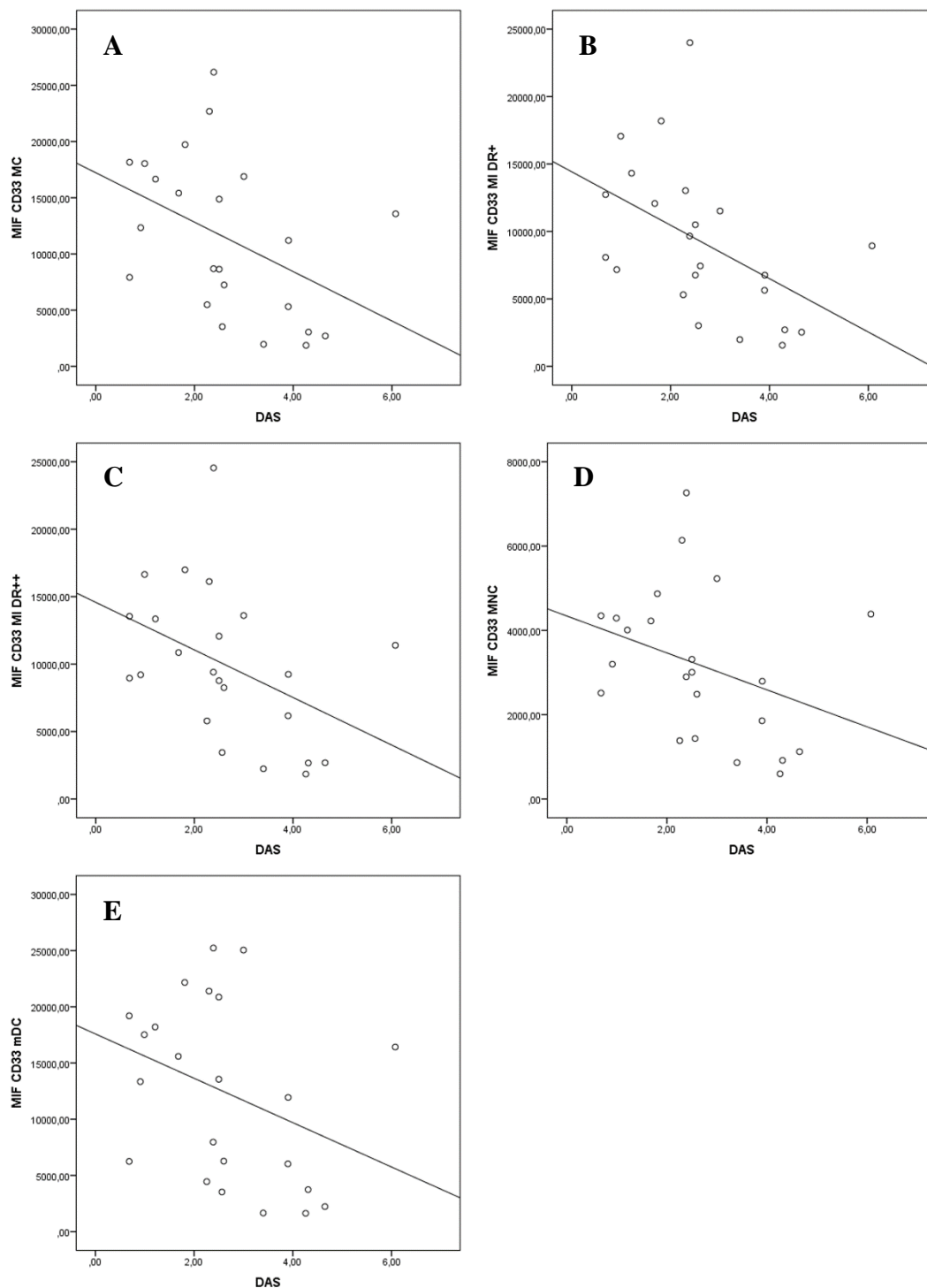


Figura 12. Correlação da MIF de CD33 de **A)** monócitos clássicos ($y=17223-2198x$; $r^2=0,187^*$), **B)** intermédios DR⁺ ($y=14422-1980x$; $r^2=0,234^*$), **C)** intermédios DR⁺⁺ ($y=14578-1763x$; $r^2=0,189^*$), e **D)** não clássicos ($y=4341-438,21x$; $r^2=0,119$), e de **E)** mDC ($y=17589-1973x$; $r^2=0,119$), com o índice DAS dos doentes com AR.

* - coeficiente de correlação significativo, $p < 0,05$.

2.3. Expressão de CD123

A expressão de CD123 para as várias subpopulações celulares estudadas encontra-se representada na Figura 13. A expressão desta molécula é bastante mais forte na pDC, sendo quase 10 vezes maior do que nas restantes subpopulações. É também a única subpopulação que apresenta uma diferença significativa entre os dois grupos, estando a expressão de CD123 aumentada no grupo de doentes com AR. Apenas os monócitos intermédios HLA-DR⁺ mostraram uma correlação negativa fraca e não significativa entre a expressão de CD123 e a atividade da doença, representada na Figura 14.

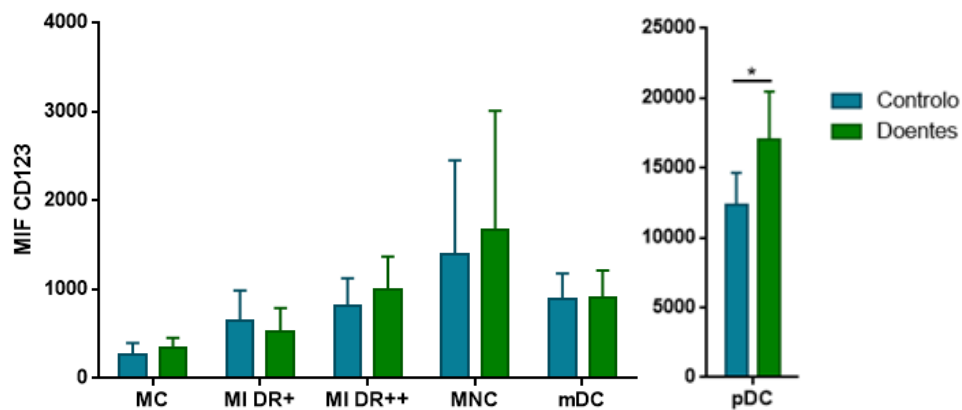


Figura 13. MIF de CD123 para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

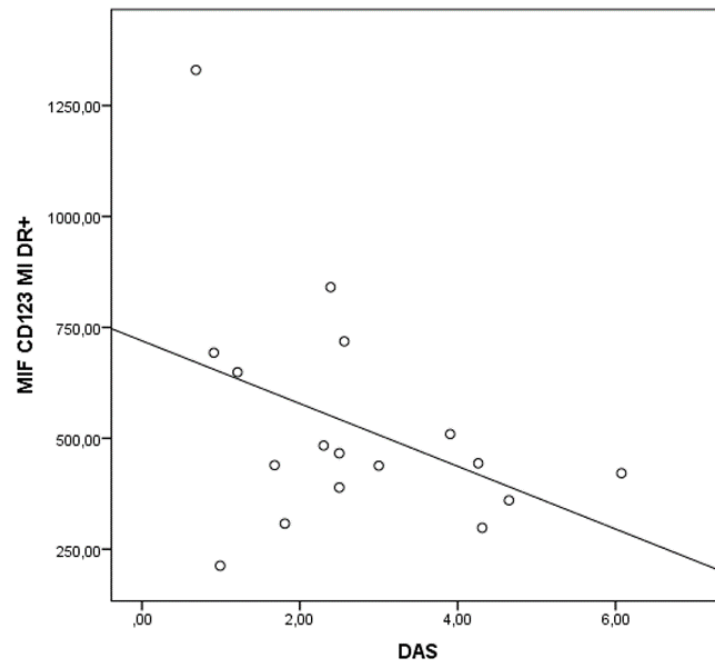


Figura 14. Correlação da MIF de CD123 de monócitos intermédios DR⁺ ($y = 719,65 - 70,72x$; $r^2 = 0,164$) com o índice DAS dos doentes com AR.

2.4. Expressão de HLA-DR

A expressão de HLA-DR nas várias subpopulações para os dois grupos de estudo encontra-se representada na Figura 15. Apenas se registou uma diferença estatisticamente significativa nos monócitos intermédios HLA-DR⁺, com uma diminuição da expressão de HLA-DR no grupo dos doentes. Em relação à expressão de HLA-DR em função do DAS, não foram encontradas correlações entre os dois parâmetros para nenhuma subpopulação de monócitos ou DC.

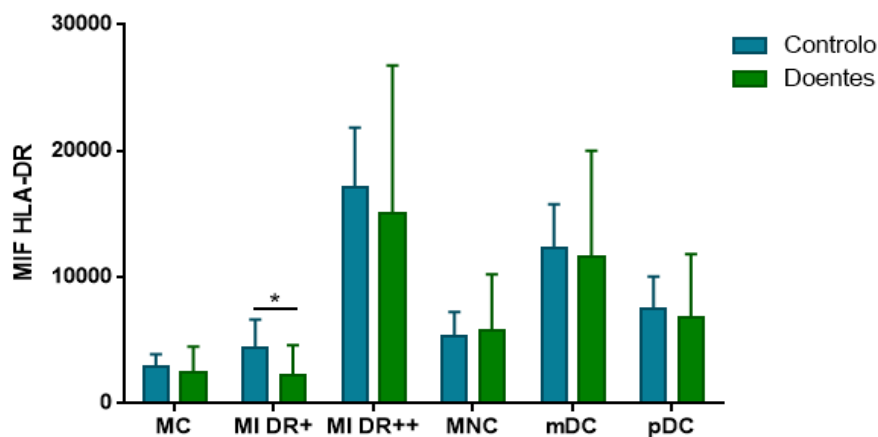


Figura 15. MIF de HLA-DR para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

2.5. Expressão de CD68

A expressão de CD68 para as várias subpopulações celulares encontra-se representada na Figura 16, tendo-se observado um aumento da expressão de CD68 no grupo AR nos monócitos intermédios HLA-DR⁺⁺ e nos monócitos não clássicos, e não se observando qualquer correlação entre este parâmetro e o índice DAS.

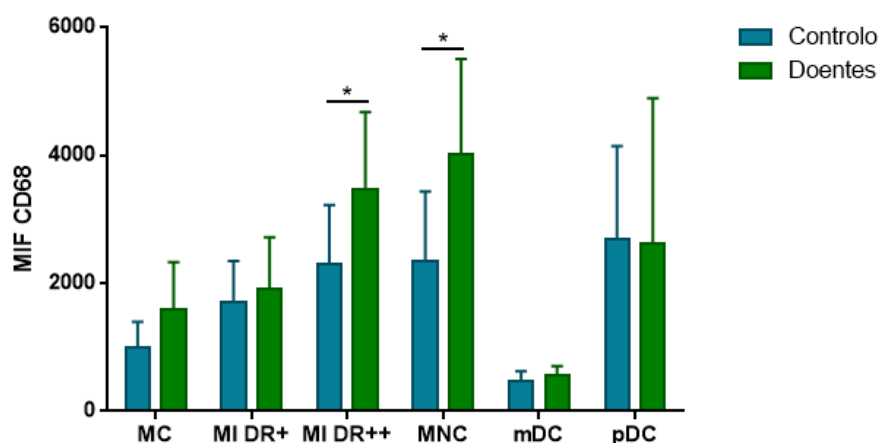


Figura 16. MIF de CD68 para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

2.6. Expressão de CD300e

A expressão de CD300e (IREM-2) encontra-se representada na Figura 17. A expressão desta molécula encontra-se significativamente aumentada na maioria das subpopulações de monócitos e nas mDC do grupo de doentes com AR, comparativamente com o grupo controlo. No entanto, não houve correlação entre a expressão desta molécula e o índice DAS.

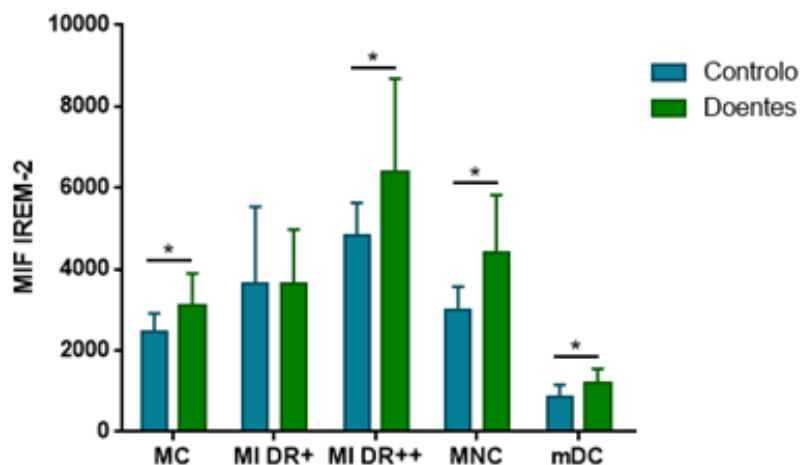


Figura 17. MIF de CD300e (IREM-2) para as subpopulações de monócitos e DC no grupo controlo e no grupo de doentes.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

3. Expressão génica de IL-10, IL-12p35, TNF- α e CX3CR1 nas subpopulações de monócitos e células dendríticas

Foi avaliada a expressão génica de IL-10, IL-12p35, TNF- α e CX3CR1 em 13 indivíduos do grupo controlo e 17 doentes com AR para as subpopulações de monócitos em estudo, e em 9 indivíduos do grupo controlo e 17 doentes com AR para as subpopulações de DC, após separação celular das várias frações celulares.

3.1.1. Expressão génica de IL-10

4. Observou-se um aumento significativo da expressão génica de IL-10 nos monócitos clássicos e intermédios no grupo de pacientes com AR (Figura 19). Não foi encontrada nenhuma correlação entre esta e o índice DAS.

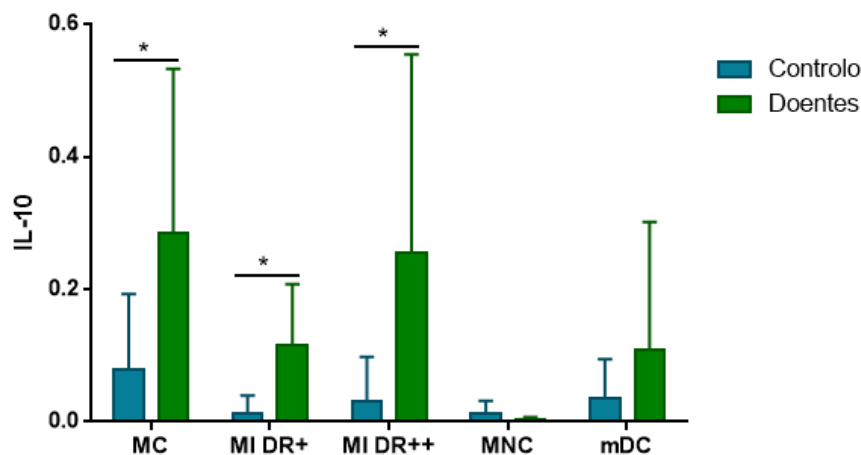


Figura 18. Expressão génica de IL-10 nos monócitos clássicos, intermédios HLA-DR⁺, intermédios HLA-DR⁺⁺ e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

4.1.1. Expressão génica de IL-12p35

Observou-se um aumento significativo da expressão génica de IL-12p35 nos monócitos intermédios HLA-DR⁺ no grupo de pacientes com AR (Figura 20). Para esta citocina, não foi encontrada alguma correlação entre a sua expressão em nenhuma subpopulação e a atividade da doença.

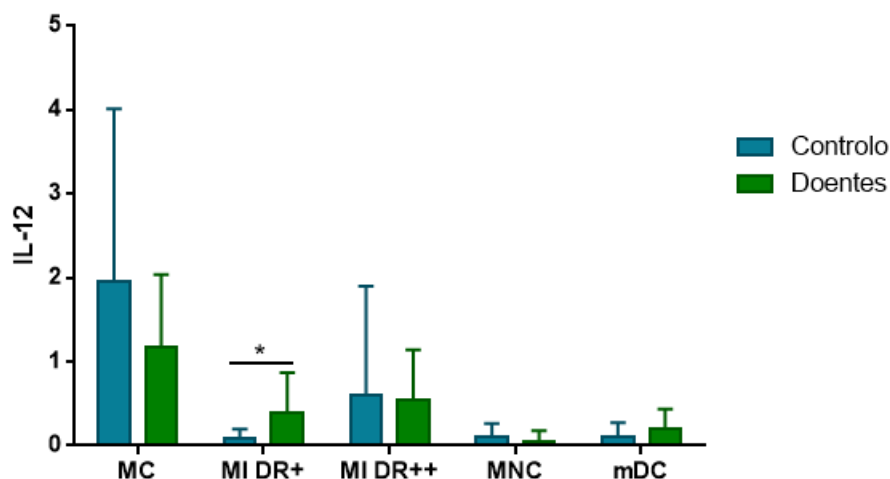


Figura 19. Expressão génica de IL-12p35 nos monócitos clássicos, intermédios DR⁺, intermédios DR⁺⁺ e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

4.1.2. Expressão génica de TNF- α

Observou-se um aumento significativo da expressão génica de TNF α nos monócitos intermédios HLA-DR⁺ no grupo de pacientes com AR (Figura 21). Relativamente à expressão génica desta citocina em função do índice DAS, apenas os monócitos não clássicos apresentaram uma correlação entre os dois parâmetros, sendo esta uma correlação negativa moderada e significativa (Figura 21).

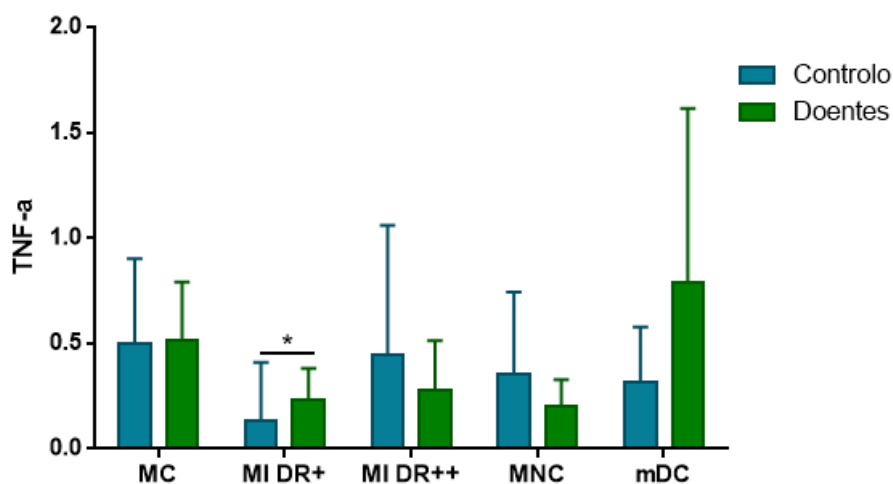


Figura 20. Expressão génica de TNF- α nos monócitos clássicos, intermédios DR⁺, intermédios DR⁺⁺ e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

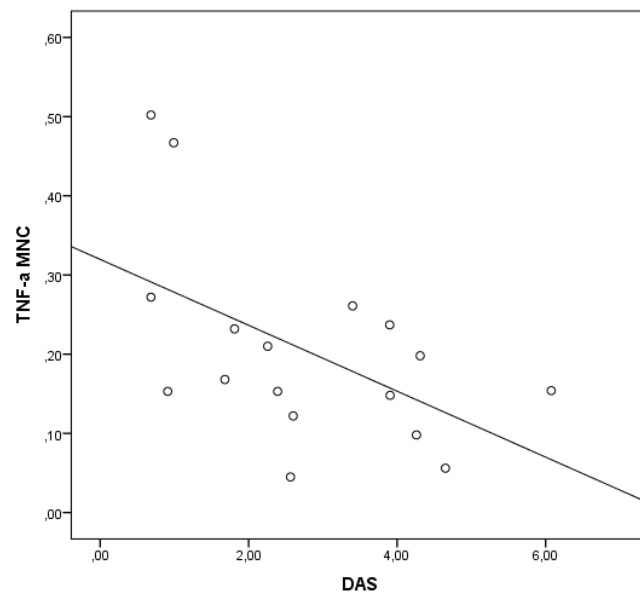


Figura 21. Correlação expressão génica de TNF- α por monócitos não clássicos ($y=0,32-0,042x$; $r^2=0,282^*$) com o índice DAS dos doentes com AR.

* - coeficiente de correlação significativo, $p<0,05$.

4.1.3. Expressão génica de CX3CR1

O gráfico da Figura 22 representa a média de expressão génica de CX3CR1 nas subpopulações de monócitos e DC para ambos os grupos de estudo. Observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da expressão génica de CX3CR1 nos monócitos clássicos e não clássicos.

Quanto à expressão génica deste recetor em função do índice DAS, foram encontradas correlações positivas fracas e não significativas para os monócitos clássicos e não clássicos, e uma correlação positiva moderada e significativa para os monócitos intermédios HLA-DR⁺.

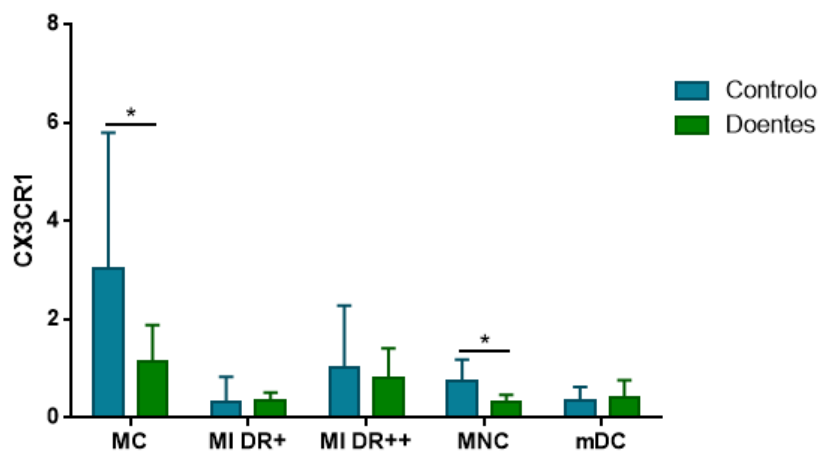


Figura 22. Expressão génica de CX3CR1 nos monócitos clássicos, intermédios DR⁺, intermédios DR⁺⁺ e não clássicos, e nas mDC. Não ocorreu amplificação génica nas pDC.

* - comparação do grupo de doentes vs grupo controlo, $p < 0,05$.

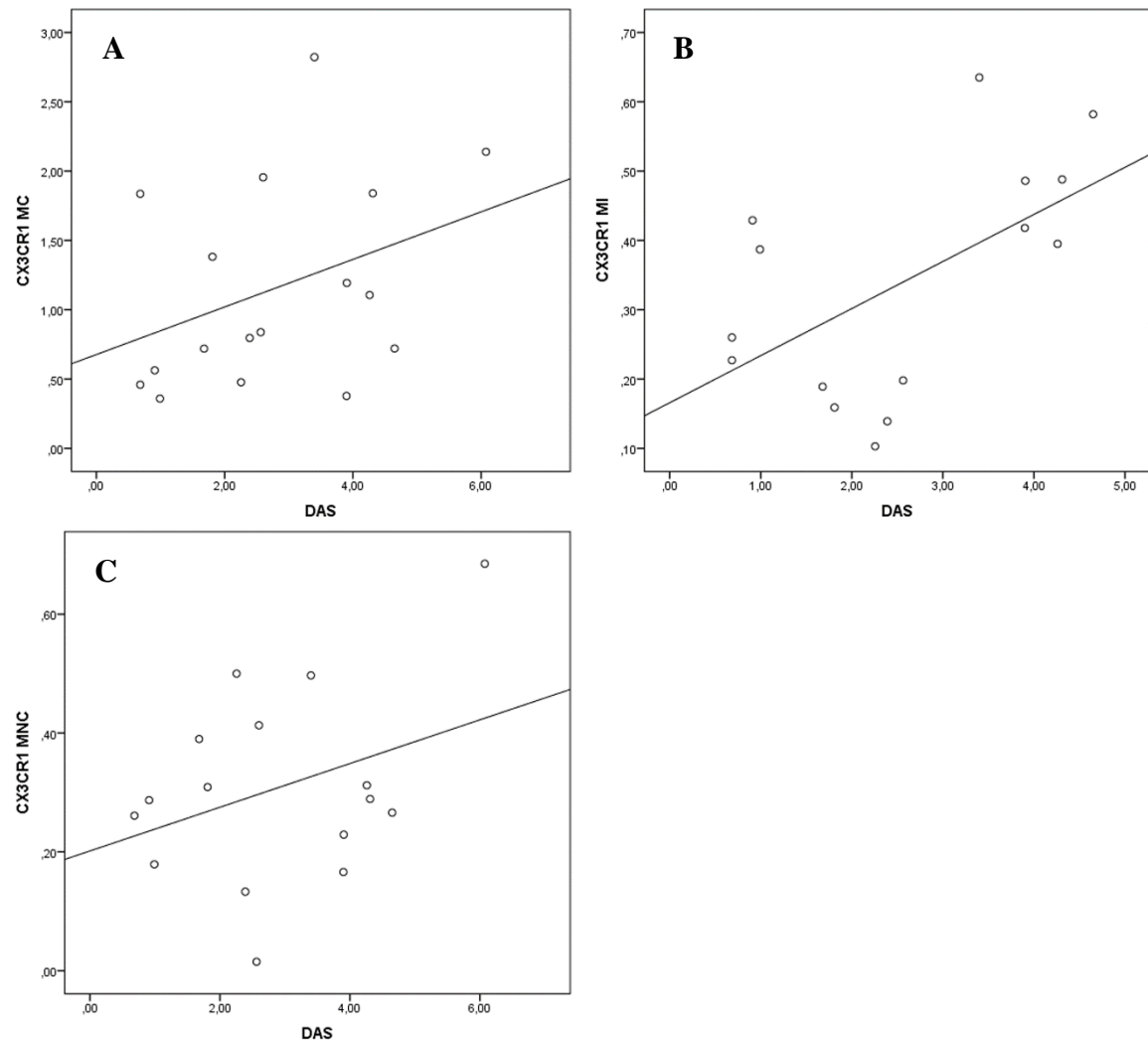


Figura 23. Correlação da MIF de CX3CR1 de **A)** monócitos clássicos ($y=0,68+0,17x$; $r^2=0,138$), **B)** intermédios DR⁺ ($y=0,17+0,07x$; $r^2=0,327^*$), e **C)** não clássicos ($y=0,20+0,04x$; $r^2=0,120$), com o índice DAS dos doentes com AR.

* - coeficiente de correlação significativo, $p<0,05$.

Discussão

A Artrite Reumatoide é uma doença crónica autoimune e inflamatória, que afeta principalmente as articulações, podendo levar à destruição e deformação destas e a várias complicações sistémicas quando não é detetada e tratada atempadamente. As situações de autoimunidade e inflamação crónica que caracterizam esta doença mostram um papel dominante do sistema imunitário na AR, nomeadamente da imunidade inata, que se encontra implicada na patogénese da doença não só pelo papel que assume na apresentação de auto-antígenos, como também pelo número aumentado de leucócitos no fluido e tecido sinoviais e pela libertação de níveis bastante elevados de várias citocinas pró-inflamatórias características deste tipo de imunidade (92, 114).

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia da AR, da evolução da resposta inflamatória e da propagação da doença a nível sistémico, torna-se importante estudar e caracterizar as várias células do sistema imunitário, não só a nível local da sinóvia, mas também a nível geral no sangue periférico. Assim, este estudo centrou-se na importância dos monócitos e células dendríticas circulantes no sangue periférico de doentes com AR, devido ao seu papel como células apresentadoras de antígenos e produtoras de citocinas, que migram para o local de inflamação e participam na perpetuação do tipo de resposta imunitária que ocorre nesta patologia.

Foram descritas várias subpopulações de monócitos e DC, de acordo com o seu fenótipo, a sua localização e a sua função. Os monócitos circulantes no sangue periférico foram recentemente divididos de acordo com a sua expressão de CD14 e CD16 (12), em monócitos clássicos, envolvidos em processos fagocitários (10); monócitos intermédios, que participam na apresentação de antígenos aos linfócitos T (13); e monócitos não clássicos, que apresentam um comportamento de patrulha do endotélio e desempenham um papel efetor na resposta inflamatória (13, 14). Por sua vez, as DC presentes no sangue podem ser divididas em DC plasmacitoides, as principais células produtoras de IFN do tipo I (17), e dois subtipos de DC mieloides, que promovem a ativação de linfócitos T através da apresentação de antígenos (12). Neste trabalho, foram identificadas quatro subpopulações de monócitos e duas de DC no sangue periférico de doentes com AR e de um grupo controlo.

Observou-se um decréscimo do número absoluto e frequência de monócitos não clássicos no sangue periférico de doentes com AR. Estes resultados vão ao encontro do que

foi descrito num estudo de Klimek *et al.* (97), que descreve uma diminuição da percentagem desta subpopulação. No entanto, este mesmo estudo e outros descrevem um aumento do número e frequência de monócitos intermédios no sangue periférico (96, 97, 108), mas neste trabalho observou-se uma diminuição da frequência dos monócitos intermédios HLA-DR⁺.

A diminuição do número e frequência dos monócitos não clássicos no sangue periférico de doentes com AR sugere um aumento da migração deste subtipo para a sinóvia inflamada, consistente com o papel pró-inflamatório atribuído a este grupo de células. A função de patrulha do endotélio associada aos monócitos não clássicos pode também tornar esta subpopulação mais propensa à migração para os tecidos inflamados, como acontece na AR.

Para uma melhor compreensão das potenciais vias de migração dos monócitos na AR, avaliou-se a expressão génica do recetor de fractalcina (CX3CR1). As quimiocinas são citocinas envolvidas na migração das células para os tecidos, sendo a fractalcina um dos seus membros, envolvida na extravasão de monócitos para o local de inflamação, e que se encontra em níveis elevados no líquido e tecido sinovial de indivíduos afetados por AR (99, 100). De igual forma, monócitos CD16⁺ na camada sinovial expressam níveis mais elevados de CX3CR1 (99), embora um estudo tenha relatado este aumento mais associado aos monócitos intermédios (108). Assim, espera-se que monócitos que expressem níveis mais elevados de CX3CR1 apresentem maior capacidade de migração dependente da concentração do ligando deste recetor, a fractalcina. No entanto, neste estudo, observou-se uma diminuição da expressão génica de CX3CR1 nos monócitos clássicos e não clássicos, o que sugere que a migração destas células para a sinóvia não é dependente de fractalcina, contrariamente ao descrito na literatura (99, 100). Por outro lado, a expressão génica do CX3CR1 mostrou uma correlação positiva com o índice DAS para todos os monócitos exceto para os monócitos intermédios HLA-DR⁺⁺, o que sugere que nas formas mais agressivas da doença, ocorre uma maior capacidade de migração destas células mediada pela fractalcina.

Nos monócitos clássicos, embora não se tenham observado diferenças entre os dois grupos quanto ao seu número absoluto, observou-se uma correlação fraca e positiva com o índice DAS. Assim, doentes com uma atividade mais elevada mostram um aumento do número absoluto de monócitos clássicos no sangue periférico, o que poderá refletir um aumento da produção de monócitos a nível da medula óssea, numa tentativa de compensar a

diminuição do número destas células no sangue periférico devido à sua migração exacerbada para os tecidos. Estes monócitos mais recentes, não tendo ainda sido expostos aos mesmos estímulos, poderão exibir um menor nível de ativação, hipótese apoiada pela correlação negativa observada entre a expressão de CD14 nos monócitos clássicos e o índice DAS.

No grupo de doentes com AR, observou-se um aumento marcado da expressão de CD14 em todas as subpopulações, bem como um aumento da expressão de CD68 e CD300e nos monócitos não clássicos e monócitos intermédios HLA-DR⁺. Foi também analisada a expressão génica de algumas citocinas, tendo-se observado um aumento da expressão de IL-10 em todas as subpopulações de monócitos exceto nos monócitos não clássicos.

Os recetores CD14 e CD300e podem ser considerados marcadores de ativação dos monócitos, nomeadamente pelo seu papel na regulação da resposta imunitária e da sobrevivência celular (115, 116). O CD68 é uma glicoproteína lisossomal expressa principalmente por fagócitos mononucleares, nomeadamente macrófagos, e pode ser utilizado não só para identificação destas células, mas também como marcador de ativação destas (117). A maior expressão destas moléculas nas diferentes populações de monócitos nos doentes sugere um limiar de ativação maior destas células no sangue periférico, que poderá ser devido à presença de estímulos inflamatórios, como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α (74), resultantes da inflamação crónica observada na AR.

Em concordância com esta hipótese levantada, observou-se um aumento da expressão génica de TNF- α e de IL-12p35, uma das duas subunidades de IL-12, nos monócitos intermédios HLA-DR⁺. De facto, já foram descritos níveis aumentados destas duas citocinas em diferentes doenças autoimunes, e particularmente na AR (69, 118, 119). No entanto, observou-se uma correlação negativa para a expressão génica do TNF- α nos monócitos não clássicos e o índice DAS.

Observou-se também um aumento da expressão génica de IL-10, uma citocina classicamente descrita com tendo um papel anti-inflamatório, mas que possui funções pleiotrópicas. Esta citocina está envolvida na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , e de IL-12, e na redução da capacidade de apresentação de antígenos por parte dos macrófagos e DC (120). Este aumento de produção de IL-10 poderá refletir uma tentativa de controlo da resposta inflamatória, e é consistente com estudos que relatam um aumento dos níveis de IL-10 (71, 121).

Observou-se uma correlação negativa da expressão de CD33 em função do DAS para todas as subpopulações de monócitos, atingindo esta significado estatístico para monócitos clássicos e intermédios. A estimulação via CD33 leva à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e à regulação das funções dos monócitos, estando assim envolvida na regulação da inflamação (109, 110). Assim, o decréscimo da expressão de CD33 em doentes com atividade elevada da doença pode refletir-se numa maior atividade pró-inflamatória exercida por estas células.

Relativamente às subpopulações de DC, observou-se um decréscimo acentuado tanto do número absoluto como da frequência de DC mieloides e plasmacitoides, o que corrobora o que já está descrito na literatura (102, 103). Este achado já tinha sido também observado para os monócitos não clássicos, e sugere que as DC migram para a sinóvia inflamada, levando a uma diminuição dos seus valores no sangue periférico, hipótese apoiada pelo número elevado de DC encontradas nesse tecido em doentes com AR, que foi descrito noutros estudos (102-104). Observou-se também uma correlação negativa entre a percentagem de mDC e a atividade de doença, o que pode ser sugestivo de uma maior taxa de migração destas células para os tecidos em função de uma maior inflamação e severidade da doença.

Também na mesma linha do que foi detetado nas subpopulações de monócitos, observou-se um aumento da expressão de CD300e nas mDC e de CD123 nas pDC do grupo de doentes, o que reforça a hipótese de um aumento da ativação periférica destas células devido a um ambiente mais pró-inflamatório. O aumento da expressão de CD123 nas pDC indica uma maior sensibilização destas células à IL-3, um fator de crescimento das células estaminais hematopoiéticas (1) e uma potente ativadora das pDC (122).

Tal como nos monócitos, encontrou-se também uma correlação negativa para a expressão de CD33 nas mDC, o que pode reforçar a hipótese sugerida de uma menor atividade anti-inflamatória nestas células em função da severidade da doença.

Conclusões

Observaram-se alterações significativas nas diferentes subpopulações de monócitos e de células dendríticas do sangue periférico na AR, quer ao nível da frequência e número absoluto quer ao nível da sua função, o que reforça o seu papel na fisiopatologia desta doença. A diminuição geral observada da frequência e número de monócitos intermédios HLA-DR⁺, monócitos não clássicos e DC no sangue periférico de doentes com AR pode ser indicativa de um aumento da migração destas células para a sinóvia inflamada. Nos monócitos, esta migração parece ser independente da fractalcina, exceto nos casos de maior atividade da doença, como evidenciado pela correlação positiva da expressão génica do recetor da fractalcina em função do índice DAS. As subpopulações celulares estudadas parecem estar mais ativadas nos doentes com AR. O seu estado de ativação encontra-se traduzido pelo aumento da expressão de CD14, CD300e e de CD68 nos monócitos, de CD300e nas mDC e de CD123 nas pDC, e pode estar associado à inflamação periférica que ocorre na AR. Os monócitos HLA-DR⁺ parecem também ter um perfil mais pró-inflamatório, traduzido pelo aumento da expressão de TNF- α e IL-12. Por outro lado, a maioria das subpopulações estudadas apresentaram um aumento da expressão génica de IL-10, podendo este aumento estar associado a uma tentativa de regulação negativa da inflamação por parte destas células. A correlação positiva do número absoluto de monócitos clássicos em função da atividade da doença, juntamente com a correlação negativa da expressão de CD14 por esta subpopulação, sugere que a migração dos monócitos para o local de inflamação despoleta um aumento da produção destas células na medula óssea, estando estas num estado de menor ativação.

Os resultados obtidos permitem assim concluir que os monócitos e DC encontram-se alterados a nível fenotípico e funcional, reforçando assim o envolvimento destas células na fisiopatologia e progressão da AR.

Referências

1. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J. Kuby immunology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2013. xxvii, 692, 109 p. p.
2. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2009;373(9664):659-72.
3. Lewis KL, Reizis B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(8):a007401.
4. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
5. Longo DL, Harrison TR, Attia E, Beal MF, DeAngelis LM, Scher HI. Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill Medical,; 2012.
6. Paul WE. *Fundamental Immunology*: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
7. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
8. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. London ; New York: Garland Science/Taylor & Francis Group; 2012. xix, 868 p. p.
9. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.
10. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res*. 2012;53(1-3):41-57.
11. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007;81(3):584-92.
12. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16):e74-80.
13. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*. 2011;118(5):e16-31.
14. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375-86.
15. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585-93.
16. Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med*. 2004;200(11):1519-24.
17. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-604.
18. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*. 2007;219:118-42.
19. Steinman RM, Idoyaga J. Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*. 2010;234(1):5-17.
20. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(6):476-83.
21. Buckwalter MR, Albert ML. Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr Biol*. 2009;19(9):R355-61.

22. Ueno H, Schmitt N, Klechevsky E, Pedroza-Gonzalez A, Matsui T, Zurawski G, et al. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* 2010;234(1):199-212.
23. Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammiceli C, et al. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood.* 2007;109(12):5371-9.
24. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557-69.
25. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002;100(13):4512-20.
26. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000;165(11):6037-46.
27. Segura E, Amigorena S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol Lett.* 2014;158(1-2):73-8.
28. Cao W. Molecular characterization of human plasmacytoid dendritic cells. *J Clin Immunol.* 2009;29(3):257-64.
29. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:163-83.
30. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(1):3-19.
31. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 2008;29(3):352-61.
32. Sompayrac L. How the immune system works. 4th ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012. ix, 141 p. p.
33. Shachar I, Karin N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol.* 2013;93(1):51-61.
34. Reumatologia IPd. Números Artrite Reumatoide [Internet]. 2013 [cited 2013 15 Out]. Available from: <http://www.ipr.pt/index.aspx?p=MenuPage&MenuId=155>.
35. Reumatologia SPd. O que acontece ao longo da doença? [Internet]. 2013 [cited 2014 24 Jan]. Available from: <http://www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide/o-que-acontece-ao-longo-da-evolucao-da-doenca-/24>.
36. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423(6937):356-61.
37. Kasper DL, Longo DL, Fauci AS, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed: McGraw-Hill; 2005.
38. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest.* 1998;101(1):273-81.
39. De Rycke L, Peene I, Hoffman IE, Kruithof E, Union A, Meheus L, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(12):1587-93.
40. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):155-63.

41. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(10):2741-9.
42. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):380-6.
43. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(8):1831-5.
44. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R949-58.
45. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):30-7.
46. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet.* 1989;36(3):178-82.
47. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004;75(2):330-7.
48. Carlton VE, Hu X, Chokkalingam AP, Schrodi SJ, Brandon R, Alexander HC, et al. PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2005;77(4):567-81.
49. Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun.* 2005;6(2):129-33.
50. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007;357(10):977-86.
51. Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med.* 2007;4(9):e278.
52. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007;39(12):1477-82.
53. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30(11):1205-13.
54. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3433-8.
55. Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TWJ, Toes REM, Vries RRPd. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2006;54(4):1117-21.

56. Klockars M, Koskela RS, Järvinen E, Kolari PJ, Rossi A. Silica exposure and rheumatoid arthritis: a follow up study of granite workers 1940-81. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;294(6578):997-1000.
57. Olsson AR, Skogh T, Axelson O, Wingren G. Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis. *Occup Environ Med*. 2004;61(3):233-8.
58. Sverdrup B, Källberg H, Bengtsson C, Lundberg I, Padyukov L, Alfredsson L, et al. Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6):R1296-303.
59. Oliver JE, Silman AJ. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2006;35(3):169-74.
60. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R133.
61. Källberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, Pedersen M, Padyukov L, Garred P, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis: results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):222-7.
62. Aho K, Heliövaara M. Alcohol, androgens and arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(12):897.
63. Frampton GK. Comment on: alcohol consumption is inversely associated with risk and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(2):423-4.
64. Silman AJ, Newman J, MacGregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum*. 1996;39(5):732-5.
65. Karlson EW, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):910-7.
66. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):835-41.
67. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3085-92.
68. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):38-46.
69. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429-42.
70. Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol*. 2006;21(5):557-66.
71. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2001;344(12):907-16.
72. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*. 2000;43(2):250-8.

73. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 2011;343(2):289-302.
74. Firestein GS, Kelley WN, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2012.
75. Forsblad D'Elia H, Larsen A, Waltbrand E, Kvist G, Mellström D, Saxne T, et al. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(7):617-23.
76. Ton FN, Gunawardene SC, Lee H, Neer RM. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *J Bone Miner Res.* 2005;20(3):464-70.
77. van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(12):1383-9.
78. Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LT, Klareskog L, Nyberg F, Rantapää-Dahlqvist S, et al. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med.* 2010;268(6):578-85.
79. Turesson C, Jarenros A, Jacobsson L. Increased incidence of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from a community based study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(8):952-5.
80. del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001;44(12):2737-45.
81. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003;108(24):2957-63.
82. Wilson A, Yu HT, Goodnough LT, Nissenson AR. Prevalence and outcomes of anemia in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004;116 Suppl 7A:50S-7S.
83. Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R45.
84. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315-24.
85. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-81.
86. van der Heijde DM, van 't Hof MA, van Riel PL, Theunisse LA, Lubberts EW, van Leeuwen MA, et al. Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann Rheum Dis.* 1990;49(11):916-20.
87. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44-8.
88. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(2):244-57.

89. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796-806.
90. Gaujoux-Viala C, Mouterde G, Baillet A, Claudepierre P, Fautrel B, Le Loët X, et al. Evaluating disease activity in rheumatoid arthritis: which composite index is best? A systematic literature analysis of studies comparing the psychometric properties of the DAS, DAS28, SDAI and CDAI. *Joint Bone Spine*. 2012;79(2):149-55.
91. Nijmegen RU. DAS28 - How to calculate the DAS28 [Internet]. 2013 [cited 2013 2 Nov]. Available from: <http://www.das-score.nl/das28/en/difference-between-the-das-and-das28/how-to-measure-the-das28/how-to-calculate-the-das28.html>.
92. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010;36(2):271-96.
93. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(6):224.
94. Davignon JL, Hayder M, Baron M, Boyer JF, Constantin A, Apparailly F, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(4):590-8.
95. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, et al. CD14⁺, CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2578-86.
96. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):671-7.
97. Klimek E, Mikołajczyk T, Sulicka J, Kwaśny-Krochin B, Korkosz M, Osmenda G, et al. Blood monocyte subsets and selected cardiovascular risk markers in rheumatoid arthritis of short duration in relation to disease activity. *Biomed Res Int*. 2014;2014:736853.
98. Umehara H, Tanaka M, Sawaki T, Jin ZX, Huang CR, Dong L, et al. Fractalkine in rheumatoid arthritis and allied conditions. *Mod Rheumatol*. 2006;16(3):124-30.
99. Yano R, Yamamura M, Sunahori K, Takasugi K, Yamana J, Kawashima M, et al. Recruitment of CD16⁺ monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients. *Acta Med Okayama*. 2007;61(2):89-98.
100. Clark AK, Staniland AA, Malcangio M. Fractalkine/CX3CR1 signalling in chronic pain and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(10):1707-14.
101. Lutzky V, Hannawi S, Thomas R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Dendritic cells. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):219.
102. Jongbloed SL, Lebre MC, Fraser AR, Gracie JA, Sturrock RD, Tak PP, et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(1):R15.
103. Richez C, Schaefferbeke T, Dumoulin C, Dehais J, Moreau JF, Blanco P. Myeloid dendritic cells correlate with clinical response whereas plasmacytoid dendritic cells impact autoantibody development in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R100.
104. Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KM, de Jager W, Radstake TR, Lafeber FP, et al. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R155.
105. Lebre MC, Tak PP. Dendritic cells in rheumatoid arthritis: Which subset should be used as a tool to induce tolerance? *Hum Immunol*. 2009;70(5):321-4.

106. Zhao Y, Zhang A, Du H, Guo S, Ning B, Yang S. Tolerogenic dendritic cells and rheumatoid arthritis: current status and perspectives. *Rheumatol Int.* 2012;32(4):837-44.
107. Hilkens CM, Isaacs JD. Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now? *Clin Exp Immunol.* 2013;172(2):148-57.
108. Yoon BR, Yoo SJ, Choi YH, Chung YH, Kim J, Yoo IS, et al. Functional Phenotype of Synovial Monocytes Modulating Inflammatory T-Cell Responses in Rheumatoid Arthritis (RA). *PLoS One.* 2014;9(10):e109775.
109. Lajaunias F, Dayer JM, Chizzolini C. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):243-51.
110. Crocker PR, Redelinghuys P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 6):1467-71.
111. Gasiorowski RE, Ju X, Hart DN, Clark GJ. CD300 molecule regulation of human dendritic cell functions. *Immunol Lett.* 2013;149(1-2):93-100.
112. Brckalo T, Calzetti F, Pérez-Cabezas B, Borràs FE, Cassatella MA, López-Botet M. Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(3):722-32.
113. Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, Meisel C, Zipp F, Ransohoff RM, et al. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology.* 2011;133(1):62-73.
114. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205-19.
115. Jersmann HP. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(5):462-7.
116. Clark GJ, Ju X, Tate C, Hart DN. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends Immunol.* 2009;30(5):209-17.
117. Song L, Lee C, Schindler C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J Lipid Res.* 2011;52(8):1542-50.
118. Pope RM, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(4):252-6.
119. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF-alpha measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2006;25(4):448-52.
120. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):271-83.
121. Alanrää T, Karstila K, Moilanen T, Silvennoinen O, Isomäki P. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scand J Rheumatol.* 2010;39(2):118-26.
122. Ghirelli C, Zollinger R, Soumelis V. Systematic cytokine receptor profiling reveals GM-CSF as a novel TLR-independent activator of human plasmacytoid predendritic cells. *Blood.* 2010;115(24):5037-40.